

**INSULINDEGRADATION
UND INSULINREZEPTORBINDUNG
VON ERYTHROZYTEN BEI
INSULINBEHANDELTEN
DIABETIKERN**

Veronika Schott

*Dies
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der III. Medizinischen Abteilung des städtischen
akademischen Lehrkrankenhauses München Schwabing

Direktor: Professor Dr. H. Mehnert

und der Forschergruppe Diabetes München

Leiter: Professor Dr. H. Mehnert

INSULINDEGRADATION UND INSULINREZEPTORBINDUNG VON
ERYTHROZYTEN BEI INSULINBEHANDELTEN DIABETIKERN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Veronika Schott

aus

Moosburg

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Standl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. März 1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. PROBANDEN	3
2.1 Gesunde Kontrollpersonen	4
2.2 Typ I Diabetiker	4
2.3 Insulinbehandelte Typ II Diabetiker	5
2.4 Insulinresistente Diabetiker	6
3. METHODEN	7
3.1 Aufteilung der Blutproben	7
3.2 Messung der spezifischen Insulinaseaktivität in Erythrozyten	9
3.2.1 Testansatz	9
3.2.2 Testdurchführung	11
3.2.3 Testauswertung	12
3.3 Insulinbindung an Erythrozyten	14
3.3.1 Vorbereitung der Proben	14
3.3.2 Testablauf	16
3.3.3 Auswertung	17
3.4 Insulinbestimmung im Plasma	18
3.4.1 Erstellung einer Standardkurve	18
3.4.2 Bestimmung der Einzelwerte	19
3.5 Semiquantitative Insulinantikörperbestimmung im Plasma	20
3.6 Hämoglobinmessung im Hämolysat des Insulinase- testes	22
3.7 Cholesterinbestimmung im Plasma	23
3.8 Triglyzeridbestimmung im Plasma	24
3.9 Messung der HbA ₁ -Fraktion des Gesamthämoglobins	25

	Seite
4. ERGEBNISSE	27
4.1 Messung der Insulinaseaktivität	27
4.2 Ergebnisse des Insulinbindungstestes an Erythrozyten	30
4.3 Auswertung der Insulin- und Insulinantikörperbestimmung	36
4.4 Korrelationen der einzelnen Versuche	38
5. DISKUSSION	41
5.1 Insulinaseaktivität der untersuchten Gruppen	41
5.2 Insulinbindung	46
6. ZUSAMMENFASSUNG	50
7. LITERATURVERZEICHNIS	53

1. EINLEITUNG

Die physiologische Bedeutung und der Mechanismus des Insulinabbaus konnten bisher nur unvollständig geklärt werden.

In vielen tierischen und einigen menschlichen Geweben fand man ein Enzym, das Insulin proteolytisch abbaut.

So isolierten BRUSH (8) (9) (10) und KITABCHI (31) eine spezifische Protease in verschiedenen Rattenorganen, YOKONO (74) und Mitarbeiter beschrieben ein insulinabbauendes Enzym in der Skelettmuskulatur von Schweinen.

BECK-NIELSEN (4) untersuchte den Insulinabbau in menschlichen Monozyten, LANG (39) in Lymphozyten, PEDERSEN (50) in Fettzellen. Als alternativer Abbauweg wurde die Reduktion der Disulfidbrücken des Insulins durch eine Gluthathion-Transhydrogenase (1) (53) (69) beschrieben.

Mehrere Studien (5) (26) (65) lieferten Beweise dafür, daß sowohl die Insulinwirkung als auch der Abbau durch die Bindung an spezifische Zellmembranrezeptoren vermittelt werden. Die Einzelheiten dieses Vorgangs sind jedoch noch unzureichend erforscht.

DURCKWORTH (16) konnte in streptozotocin-diabetischen Ratten einen erhöhten Insulinabbau in intaktem Muskelgewebe beobachten, der durch Insulinbehandlung auf normale Werte reduziert wurde. Darüber hinaus wurde von einigen Autoren (32) (40) (42) (49) ein beschleunigter Insulinabbau als eine mögliche Erklärung für extreme Insulinresistenz vorgeschlagen.

KOLB und STANDL (34) (35) isolierten eine Protease aus menschlichen Erythrozyten, die Insulin spezifisch abbaut und ähnliche Eigenschaften aufweist wie ein gereinigtes Enzym aus menschlicher Skelettmuskulatur. (45)

Die vorliegende Arbeit untersuchte in Erythrozyten die Aktivität dieser Protease sowie die Insulinbindung an die Erythrozytenmembran, beides in Korrelation zum Seruminsulinspiegel.

Es wurden gesunde Kontrollpersonen, Typ I Diabetiker, insulinbehandelte Typ II Diabetiker und insulinresistente (Typ I und II) Diabetiker miteinander verglichen.

Besonderes Interesse galt den insulinresistenten Patienten, für deren Pathogenese kombinierte Rezeptor- und Postrezeptordefekte zunehmende Bedeutung erlangen. (6) (37)

2. PROBANDEN

Untersucht wurden 16 stoffwechselgesunde Personen, 14 gut eingestellte Typ I Diabetiker, 11 insulinbehandelte Typ II Diabetiker und 8 insulinresistente Patienten.

Zu jeder Gruppe gehörten männliche und weibliche Probanden.

Die Blutentnahme erfolgte bei allen Personen um 8 Uhr morgens nach einem 12stündigen Fasten.

Zur Stoffwechselkontrolle und Vergleichsmöglichkeit wurden der Nüchternblutzucker im Kapillarblut sowie im Plasma das Cholesterin und die Triglyzeride bestimmt (siehe 3.7 und 3.8). Zusätzlich wurde der HbA₁-Wert chromatographisch ermittelt (11) (41) (siehe 3.9).

Alle Personen gaben ihr Einverständnis und die Untersuchung war von der zuständigen Ethikkommission gebilligt.

Eine Zusammenfassung der klinischen Daten der Patienten zeigt Tab. 1:

		1	2	3	4
Alter	(Jahre)	34 ± 3	35 ± 2	69 ± 2	55 ± 8
Größe	(cm)	173 ± 2	172 ± 2	164 ± 3	166 ± 3
Gewicht	(kg)	66 ± 3	65 ± 2	69 ± 4	65 ± 4
Glukose	(mmol/l)	4,9 ± 0,2	8,1 ± 1,1	7,3 ± 1,1	7,2 ± 0,8
HbA ₁	(%)	7,1 ± 0,2	10,4 ± 0,4	14,0 ± 0,5	10,7 ± 0,7
Triglyzeride	(mmol/l)	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,4	2,2 ± 0,4
Cholesterin	(mmol/l)	5,1 ± 0,3	4,8 ± 0,2	5,4 ± 0,3	5,5 ± 0,5
Insulindosis	(IE./Tag)	-	38 ± 3	34 ± 4	92 ± 5
Diabetesdauer	(Jahre)	-	12 ± 2	10 ± 1	12 ± 3

Mittelwerte ± SEM

1: gesunde Kontrollpersonen

2: Typ I Diabetiker

3: insulinbehandelte Typ II Diabetiker

4: Insulinresistente Diabetiker

2.1 Gesunde Kontrollpersonen

Das Normalkollektiv umfaßte Personen im Alter von 22 - 66 Jahren, mit einem durchschnittlichen Gewicht von 66 kg bei einer Größe von 173 ± 2 cm. 14 der Untersuchten hatten ein Körpergewicht innerhalb ± 10 % des nach BROCA⁺ errechneten Idealgewichts.

Der Nüchternblutzucker betrug 4,9 mmol/l, die Werte für Triglyzeride, Cholesterin und HbA₁ lagen im Normbereich (siehe Tab. 1; Normbereich für HbA₁: 5 - 8,5 %).

Ebenso wie in den anderen Gruppen litt keiner der Probanden an einer akuten Infektion. Weißes und rotes Blutbild einschließlich der Retikulozytenzahl waren bei allen untersuchten Personen unauffällig.

2.2 Typ I Diabetiker

Zur Gruppe der juvenilen Diabetiker gehörten 14 Personen, deren Erkrankungsdauer von wenigen Wochen (keine Remissionsphase) bis zu 26 Jahren reichte.

Alle Probanden waren normalgewichtig (siehe Tab. 1) und erhielten eine Diabetesdiät von durchschnittlich 2200 kcal mit 20 Broteinheiten, 80 g Fett und 110 g Eiweiß. Der durchschnittliche Insulinbedarf betrug 38 Einheiten/Tag. Der Anteil des glykosylierten Hämoglobins HbA₁ lag bei 10 % des Gesamthämoglobins (siehe Tab. 1).

Am Versuchstag wurde ein Nüchternglukosewert von 8,1 mmol/l gemessen. Bei keinem der Patienten gab es Hinweise für eine ketoazidotische Stoffwechsellaage.

⁺ Idealgewicht: Körpergröße in cm - 100, vermindert um 10 (15) % bei Männern (bei Frauen).

Auch nach langer Diabetesdauer bestanden keine Anzeichen für eine renale Insuffizienz oder Leberfunktionsstörungen. Das Kollektiv setzte sich aus stationär behandelten und ambulanten Patienten zusammen. Alle Patienten besuchten regelmäßige Schulungsveranstaltungen für Diabetiker.

2.3 Insulinbehandelte Typ II Diabetiker

Zwei der 11 Personen spritzten bereits über einen längeren Zeitraum Insulin, 9 waren kürzliche Versager der oralen Therapie, sie wurden seit ca. 4 Wochen mit Insulin behandelt.

Außer zur Therapie einer Hypertonie oder einer leichten Herzinsuffizienz nahm auch in dieser Gruppe niemand Zusatzmedikamente ein.

Bei einer täglichen Insulindosis von 34 ± 4 Einheiten betrug der Nüchtern glukosewert $7,3 \pm 1$ mmol/l (Tab. 1). Keiner der Patienten schied Ketonkörper im Harn aus.

Die Untersuchten waren zwischen 64 und 79 Jahre alt, das durchschnittliche Körpergewicht von 69 kg (Größe 164 ± 3 cm) lag bei allen über dem Sollgewicht, bei drei Patienten sogar über 40 %. Die stark übergewichtigen Probanden bekamen eine Diät von 1000 kcal mit 8 BE, 30 g Fett und 75 g Eiweiß, alle anderen erhielten 1400 kcal mit 12 BE, 50 g Fett und 80 g Eiweiß.

2.4 Insulinresistente Diabetiker

Diese Probanden benötigten während einer mindestens einwöchigen stationären Beobachtung mehr als 80 Insulineinheiten täglich, ein Patient erhielt als höchste Dosis 112 Einheiten/Tag. Die Gruppe bestand aus 5 Typ II und 3 Typ I Diabetikern mit einer Erkrankungsdauer von 3 bis 22 Jahren.

5 Personen waren normalgewichtig, bei 3 lag das Körpergewicht bis zu 30 % über dem Idealgewicht. Je nach Übergewicht und körperlicher Betätigung bestand die Diät aus 1400 kcal (12 BE, 50 g Fett, 80 g Eiweiß) - 2200 kcal (20 BE, 80 g Fett, 110 g Eiweiß). Der Nüchternblutzucker am Versuchstag betrug 7,2 mmol/l, die Triglyzeride waren mit 2,2 mmol/l erhöht, der Cholesterinwert dagegen lag noch innerhalb des Normbereiches (siehe Tab. 1).

3. METHODEN

3.1 Aufteilung der Blutproben

20 ml Vollblut wurden aus einer Cubitalvene entnommen und zur Gerinnungshemmung sofort in Heparin-Röhrchen⁺ umgefüllt, wie bei (2) (20) (21) beschrieben.

Diese Röhrchen wurden eisgekühlt zur Verarbeitung in das Labor transportiert. Dort entnahm man 0,5 ml Blut zur Zählung der Retikulozyten (17) (38). Anschließend wurden die Blutproben 10 min lang bei 400 g in Raumtemperatur zentrifugiert (20) (21).

Das überstehende Plasma wurde in Eppendorf-Cups pipettiert und bei -18° C tiefgefroren, zur späteren Bestimmung von

- 1) freiem Insulin
- 2) Triglyzeriden und Cholesterin
- 3) Insulinantikörpern

Dann wurde der Leukozytensaum mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt, und die verbleibende Erythrozytenschicht wurde mit gleichen Teilen isotoner NaCl-Lösung gewaschen.

Diese Suspension konnte nun für den Bindungs- (ca. 10 ml) und Abbautest (4 ml) aufgeteilt werden (siehe Abb. 1).

⁺ Firma Terumo, Frankfurt

Abb. 1 Arbeitsschema

20 ml Blutentnahme aus einer Cubitalvene

in Heparinröhrchen gefüllt, Retikulozytenbestimmung
eisgekühlt aus 0.1 ml

zentrifugiert, 400 g, 20°C
10 min.

Erythrozyten

Waschen mit 0.9 % NaCl-Lösung

Insulinabbautest

und Hämoglobinbestimmung

Insulinbindung an Erythrozytenmembranen
und Bestimmung der Erythrozytenzahl

Plasma tiefgefroren

Insulinbestimmung

Routinelabor mit

Cholesterin und

Triglyzeriden

semi quantitative

Antikörperbestimmung

3.2 Messung der spezifischen Insulinaseaktivität in Erythrozyten

Insulinase spaltet radioaktiv markiertes und unmarkiertes Insulin in trichloressigsäurelösliche Bruchstücke.

Zu festgelegten Zeitpunkten wird ein Aliquot des Testansatzes entnommen, der Reaktionsablauf durch eine Trichloressigsäurefällung gestoppt, und anschließend zentrifugiert.

Mit zunehmender Reaktionsdauer vergrößert sich im Überstand mit dem Anteil der löslichen Spaltprodukte auch die meßbare Radioaktivität. Aus diesen Zählraten und der im Test vorhandenen Insulinmenge kann die Enzymaktivität ermittelt werden.

(34) (35)

3.2.1 Testansatz

Der Testansatz (2 ml) bestand nach SCHNEIDER (60) aus:

1) 0,5 ml TRIS-Albuminpuffer

Der Puffer wurde aus einer 10 mM Tris-(Hydromethyl)-Aminomethan-HCl-Lösung hergestellt, mit 1 mg reinstem Humanalbumin⁺ pro ml Lösung versetzt und auf den physiologischen pH-Wert 7,4 eingestellt. Dies ergab im Testansatz eine Endkonzentration des Albumins von 0,25 mg/ml.

2) 0,2 ml Jodacetamid

Um eine Beeinflussung der Enzymaktivität durch Substanzen mit freien SH-Gruppen zu vermeiden, enthielt der Testansatz eine 1 mM Jodacetamidlösung. (34) (67)

⁺ Behringwerke, Marburg

3) 0,2 ml Insulin

Als Substrat wurde monocomponentes, kristallines Schweineinsulin⁺ (1 mg = 27 Einheiten Insulin) in einer Konzentration von 0,5 mE/ml hinzugefügt. Dies ergab eine Endkonzentration von 50 μ E/ml Ansatz.

Die benötigte Insulinmenge stellte man aus einer stabilen tiefgefrorenen Stammlösung (pH 3) mit 10 E/ml durch Zusatz von Aqua dest. her.

Die gewünschte Verdünnung wurde im Kühlschrank aufbewahrt und war ca. 14 Tage haltbar.

4) 0,2 ml radioaktiv markiertes Insulin

^{125}J markiertes Rinderinsulin⁺⁺ wurde als Tracer eingesetzt. Es hatte eine spezifische Aktivität von 23,5 μ Ci/ μ g Insulin und enthielt 25 Einheiten Insulin/mg Protein.

Nach Verdünnung mit Tris-Albuminpuffer wurde es in derselben Konzentration wie das unmarkierte Insulin im Ansatz verwendet.

Dies entsprach einer Impulsrate von 100000 Imp/min.

Vor jedem Versuch wurde diese Gesamtaktivität in Doppelwerten mit je 0,2 ml markiertem Insulin bestimmt.

5) 0,4 ml Aqua dest.

6) 0,5 ml Hämolytat

Das Hämolytat wurde aus der unter 3.1 genannten Erythrozytensuspension hergestellt.

Die Blutproben zentrifugierte man 10 min mit 1600 g bei 20° C, saugte den Überstand gründlich ab und füllte die

⁺ Hormon-Chemie, München

⁺⁺ Novo Research Institute, Kopenhagen, Dänemark

Reagenzgläser wieder mit isotoner Kochsalzlösung auf. Der gesamte Waschvorgang wurde nun nochmals wiederholt.

Von dem so gewonnenen Erythrozytenkonzentrat wurden 0,2 ml mit 2 ml Aqua dest. hämolysiert. Das Hämolysat wurde kurz durchmischt, für ca. 3 Std. bei -18° C tiefgefroren und zur Weiterverwendung dann aufgetaut.

3.2.2 Testdurchführung

Der Test wurde bei exakt 37° C im Wasserbad durchgeführt. Durch Zugabe von 0,5 ml des aufgetauten Hämolysats wurde der Reaktionsablauf gestartet.

Nach 1, 5, 15 und 25 Minuten wurde je ein Aliquot (0,2 ml) des Inkubationsgemisches in vorbereitete Eppendorf-Cups pipettiert, die pro Cup 0,2 ml 5 % Trichloressigsäure enthielten. Danach durchmischte man die Proben kurz auf dem Mischrotor und zentrifugierte sie 2 min bei 10000 g.

Von dem Überstand der einzelnen Proben entnahm man nun jeweils 0,2 ml und zählte darin die Radioaktivität 5 min lang in einem Gamma-Counter.⁺

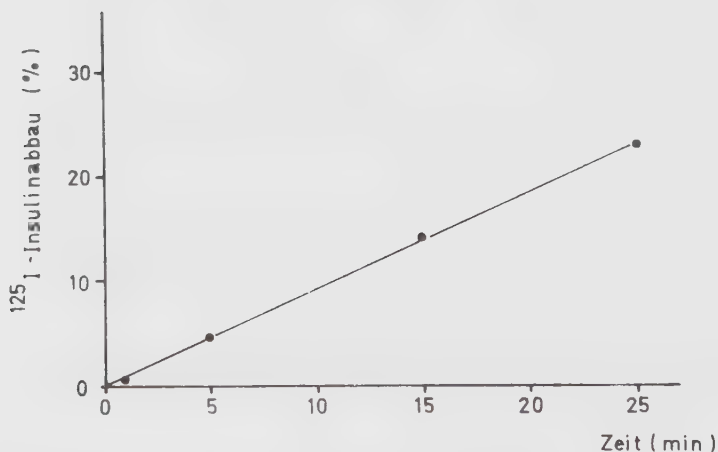
Alle Bestimmungen erfolgten als Doppelwerte.

⁺ NE 1600, Nuclear-Enterprises, Edinburgh, UK)

3.2.3 Testauswertung

Es zeigte sich während der gesamten Reaktionsdauer eine lineare Zunahme der gemessenen Radioaktivität und damit der löslichen Spaltprodukte. (Abb. 2)

Abb. 2 Beispiel zur Bestimmung der
Insulinaseaktivität



Die Zählraten wurden nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, in Prozent der Gesamtaktivität ausgedrückt.

Mit diesen Werten wurde für jeden Versuchsansatz die Regressionsgerade ermittelt, deren Einzelpunkte man um die im Überstand bereits vorhandene Radioaktivität zum Zeitpunkt Null korrigierte. (ca. 7 % der Gesamtaktivität.)

Aus der Steigung der Geraden (% Abbau/min) und der eingesetzten Insulinmenge (0,2 mE im Ansatz) konnte die Enzymaktivität pro ml Hämolytat nach der Definition von KOLB und STANDL (34) errechnet werden:

Eine Einheit (U) ist die Menge an insulinabbauender Aktivität, die in einer Minute eine μ Einheit Insulin abbaut.

Die spezifische Aktivität der Insulinase wurde auf Hämoglobin bezogen. (60)

Dazu mußte abschließend in jedem Hämolysat der Hämoglobingehalt/ml nach der Cyan-Hämoglobin-Methode bestimmt werden (24) (68) (siehe Methoden 3.6).

3.3 Insulinbindung an Erythrozyten

Radioaktiv markiertes und unmarkiertes Insulin verdrängen sich kompetitiv von den spezifischen Rezeptoren an der Erythrozytenoberfläche.

Je höher die eingesetzte unmarkierte Insulinmenge ist, um so geringer wird die gebundene Radioaktivität. Diese wird nach Entfernung des freien Insulins gemessen. Aus dem Verhältnis der Zählrate zur eingesetzten Radioaktivität kann bei den einzelnen Insulinkonzentrationen die jeweils gebundene ^{125}J -Insulinmenge ermittelt werden.

Der Test wurde modifiziert nach den Angaben von GAMBHIR und Mitarbeitern (20) (21) durchgeführt.

3.3.1 Vorbereitung der Proben

Zunächst wurde die unter 3.1 hergestellte Erythrozytensuspension weiterverarbeitet.

10 ml davon wurden auf 6 ml Ficoll Paque⁺ geschichtet und 20 min bei 400 g zentrifugiert. Ficoll Paque diente zur Abtrennung der im Blutgemisch vorhandenen Lymphozyten und Granulozyten. (7) (23)

Nach gründlichem Absaugen des Überstandes gab man zum Rückstand die zweifache Menge an Puffer G (siehe unten) und zentrifugierte in der Kälte bei 10° C, 10 min lang mit 400 g.

Nach erneutem Absaugen wurde der Rückstand genau 1 : 1 mit Puffer G verdünnt.

⁺ Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden

Während der einzelnen Zentrifugationen konnte die Inkubationsreihe vorbereitet werden. Sie bestand aus Einzelansätzen mit je

- 1) 0,05 ml Schweine-Insulin⁺ (25 Einheiten/mg Protein).

Das Insulin wurde in steigenden Konzentrationen von 2,5 μ E - 2,5 E/ml eingesetzt.

Die entsprechenden Verdünnungen waren bereits in Eppendorf-Cups mit je 0,05 ml Insulinlösung gebrauchsfertig tiefgefroren und mußten somit lediglich aufgetaut werden.

Die kompletten Einzelansätze mit je 0,5 ml Reaktionsgemisch (siehe 3.3.2) enthielten dann unmarkiertes Insulin in den Konzentrationen 0,25, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100, 1000 μ E/ml und 0,25 E/ml.

- 2) 0,05 ml Mono-¹²⁵J-TYR A14-Schweineinsulin⁺⁺ (211-295 μ C/ μ g) mit 25 Einheiten Insulin/mg Protein.

Das jodmarkierte Insulin wurde mit Puffer G verdünnt und in größeren Portionen bei -20° C aufbewahrt.

Die Konzentration des jodmarkierten Insulins betrug in jedem Reaktionsgefäß der Inkubationsreihe 160 pg/ml Ansatz. Zusätzlich wurde in 3 Röhrchen mit je 0,05 ml ¹²⁵J-Insulin für jede Inkubationsreihe die eingesetzte Gesamtaktivität (Imp/min) gemessen.

Schließlich wurde die spätere Meßreihe (Doppelwerte) vorbereitet. In die einzelnen Eppendorf-Cups pipettierte man

- 1) 0,2 ml Puffer G

Puffer G bestand nach den Angaben von GAMBHIR aus Tris 50 mM, Hepes 50 mM;

⁺ Firma Nordisk Insulinlaboratorium, Kopenhagen, Dänemark

⁺⁺ NOVO Research Institute, Kopenhagen, Dänemark

MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 mM, KCl 5 mM, NaCl 50 mM;

Edta 2 mM, Glukose 10 mM sowie 1 g Albumin/l.

Die Lösung wurde auf den pH-Wert 8 eingestellt. Zur besseren Haltbarkeit war der Puffer in Portionen, die für je einen Bindungstest reichten, tiefgefroren.

2) 0,2 ml Phtalsäuredibutylester⁺

Dieser Ester ist wegen seiner Dichte besonders zur Trennung des freien von dem an Erythrozyten gebundenen Insulin geeignet. (siehe Abb. bei (20))

Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Cups der Meßreihe im Kühlschrank aufbewahrt.

3.3.2 Testablauf

Je 0,4 ml des hergestellten Erythrozyten-Puffergemisches wurden in die vorbereiteten Cups der Inkubationsreihe pipettiert. Anschließend inkubierte man die einzelnen Proben (mit je 0,5 ml Gesamtvolumen) 4,5 Stunden bei genau 15° C im Schüttelwasserbad. Nach Beendigung der Inkubation durchmischte man den Inhalt der Teströhrchen kurz und pipettierte davon jeweils 0,2 ml als Doppelwerte entsprechend den steigenden Insulinkonzentrationen in die Meßreihe. Diese wurde dann bei 4° C mit 10000 g, 3 min lang zentrifugiert. Dadurch erzielte man eine exakte Trennung von freiem und gebundenem Insulin.

Die einzelnen Proben wurden nun in eine Holzklammer gespannt und dabei leicht gekippt, so daß der Überstand mit dem freien Insulin zu den Verschlüssen der Cups abfließen konnte. Darauf durchtrennte man die Cups genau in Höhe der zentrifugierten Erythrozytenmasse mit einem Plastikschnidegerät⁺⁺.

⁺ Firma Merck-Schuchard

⁺⁺ handelsübliche Lötpistole

Die abgeschnittenen Spitzen mit der Erythrozytenschicht wurden in Zählröhrchen aufgefangen. In diesen wurde die Radioaktivität des gebundenen Insulins 5 min im Gamma-Counter gemessen.

3.3.3 Auswertung

Aus dem Verhältnis der einzelnen Zählraten zur eingesetzten Radioaktivität in 0,2 ml Ansatz wurde der prozentuale Anteil des jeweils gebundenen ^{125}J -Insulin errechnet.

Zur Ermittlung der spezifischen Bindung subtrahierte man vom jeweiligen Prozentwert den Anteil der unspezifischen Bindung. Diese wurde aus den gemessenen Impulsen bei dem höchsten unmarkierten Insulingehalt (0,25 E/ml) bestimmt.

Das so erhaltene Ergebnis normierte man nach GAMBHIR (20) auf eine Erythrozytenzahl von $4,4 \times 10^6/\mu\text{l}$.

Deshalb wurden in der oben genannten (3.3.2) Erythrozytensuspension pro μl die Erythrozyten im Coulter Counter⁺ gezählt. Zusammenfassend ergab sich folgende Auswertung:

$$\begin{aligned} \% \text{ spezifische Bindung} &= \left[\frac{\text{gemessene Radioaktivität}}{\text{eingesetzte Radioaktivität}} \right. \\ &\quad \left. - \frac{\text{gemessene Radioaktivität bei 0,25 E}}{\text{eingesetzte Radioaktivität}} \right] \\ &\quad \times \frac{4,4}{\text{bestimmte Erythrozytenzahl}} \times 100 \end{aligned}$$

⁺ Modell S Senior

3.4 Insulinbestimmung im Plasma

Im Plasma vorhandenes unmarkiertes und zugefügtes radioaktiv-markiertes Insulin konkurrieren kompetitiv um die Bindung an spezifische Antikörper.

Die Radioaktivität der gebildeten Insulin-Antikörper-Komplexe nimmt dabei im gleichen Maß ab wie der Gehalt an unmarkiertem Insulin im Testansatz zunimmt.

Nach Abtrennung der gebundenen Fraktion und Messung der Zählrate kann aus einer Eichkurve die gesuchte Insulinkonzentration der Probe ermittelt werden. (29) (73)

Dieser Versuch wurde mit einem gebrauchsfertigen Radioimmunbesteck durchgeführt.*

3.4.1 Erstellen einer Standardkurve

Die vorgefertigten Teströhrchen enthielten jodmarkiertes Schweineinsulin (ca 100 pg) und Anti-Insulin-Serum in lyophilisierter Form.

Zunächst wurden diese Lyophilisate vorschriftsmäßig (25) mit 0,5 ml Wasser aufgelöst. Anschließend wurden in jedes Röhrchen genau 0,1 ml Standard in steigenden Konzentrationen von 0 - 320 μ E Schweineinsulin pipettiert. Jede Probe wurde dabei doppelt angesetzt. Vervollständigt wurde das Inkubationsvolumen mit 0,5 ml Wasser. Die Inkubationsgefäße wurden gründlich durchmischt und mit Parafilm verschlossen. Inkubiert wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur.

Die Trennung der gebundenen und freien Fraktion erfolgte durch Zugabe von 1 ml gebrauchsfertiger Polyäthylenglykollösung je

* RIA-gnost Insulin, Behring-Werke AG, Marburg

Röhrchen. Danach mußten die Proben nochmals auf dem Mischrotor gründlich homogenisiert werden. Sie wurden anschließend 20 min lang bei 1500 g zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, und die Radioaktivität der Niederschläge wurde eine Minute im Gamma-Counter gemessen.

Aus den Mittelwerten der Zählraten pro Einzelansatz und den bekannten Konzentrationen der Standardinsuline konnte mit Hilfe eines programmierbaren Rechners die Eichkurve errechnet werden.

3.4.2 Bestimmung der Einzelwerte

Die Insulinwerte der einzelnen Probanden wurden aus tiefgefrorenem Plasma ermittelt. (Plasmagewinnung siehe 3.1)

Anstelle der Standardkonzentrationen pipettierte man nun 0,1 ml der aufgetauten Plasmaproben jeweils als Doppelwerte in die vorbereiteten Röhrchen des Testbesteckes.

Der weitere Testablauf war mit dem unter 3.4.1 beschriebenen identisch.

Nach Fällung der Insulin-Antikörper-Komplexe und dem Entfernen des freien Insulins konnte mit den gemessenen Impulsraten die gesuchte Insulinkonzentration ($\mu\text{E/ml}$) aus der Standardkurve abgelesen werden.

3.5 Semiquantitative Insulinantikörperbestimmung im Plasma

Es wird im Plasma die Bindung einer konstanten Menge ^{125}J -Insulin an γ -Globuline und damit an vorhandene Insulinantikörper gemessen.

Nach Fällung der γ -Globulinfraction kann aus der Zählrate die ^{125}J -Insulinbindung in Prozentwerten der eingesetzten Gesamtaktivität ermittelt werden.

Diesen Test entwickelten KOLB und Mitarbeiter. (71)

Plasmaproben der Probanden (je 10 μl) wurden mit einer konstanten Menge ^{125}J -Insulin über Nacht bei $+4^\circ\text{C}$ inkubiert. Alle Proben wurden dabei doppelt angesetzt. Zur vollständigen Durchmischung der Reaktionslösung mußten die einzelnen Ansätze nach Zugabe des jodmarkierten Insulins kurz zentrifugiert werden.

Das verwendete ^{125}J -Rinderinsulin⁺ hatte eine spezifische Aktivität von 23,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Die Zählrate betrug nach Verdünnung mit 3 % Humanalbuminlösung in 10 μl ca. 10000 Imp/min. (= Gesamtaktivität)

Das eingesetzte Plasma (siehe 3.1) war mit isotoner Kochsalzlösung zweifach verdünnt.

Am darauffolgenden Tag wurde die Salz-fällung der γ -Globulinfraction durchgeführt.

Dazu pipettierte man 80 μl 80 % Ammoniumsulfatlösung zum Reaktionsgemisch und zentrifugierte nach 30 min, 5 min lang bei 10000 g.

⁺ NOVO Research Institute, Kopenhagen, Dänemark

Nach dem Zentrifugieren saugte man den Überstand mit Hilfe einer Glaspipette und einer Wasserstrahlpumpe sorgfältig ab. Anschließend wurden die einzelnen Proben mit je 40 µl Ammoniumsulfatlösung gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert.

Wiederum entfernte man den Überstand und zählte die Impulsrate des Niederschlages mit dem gebundenen ^{125}J -Insulin 2 Minuten im Gamma-Counter.

Nach Umrechnung der Zählraten in Prozentwerte der Gesamtaktivität erhielt man die Antikörperaktivität in % Bindungskapazität gegenüber ^{125}J -Insulin.

3.6 Hämoglobinmessung im Hämolysat des Insulinasetestes

Hämoglobin und Derivate - mit Ausnahme des Verdoglobins - werden durch Kaliumcyanid und Kaliumhexacyanoferrat III in Häminglobincyanid übergeführt. Die Farbintensität des Häminglobincyanids ist der Hämoglobinkonzentration proportional und wird im Photometer gemessen. (24) (68)

Reaktionslösung:⁺

1,0 mmol/l Kaliumcyanid
0,6 mmol/l Kaliumhexacyanoferrat III
2,5 mmol/l Phosphatpuffer pH 7,2
1,5 mmol/l Natriumchlorid
0,05 % Detergens

0,02 ml Hämolysat (Herstellung siehe Insulinasetest 3.2.1) und je 5 ml Reaktionslösung wurden in ein Reagenzglas pipettiert, gut durchmischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 min wurde die Extinktion der Proben gegen die Reaktionslösung bei Hg 546 nm gemessen.

Berechnung der Hämoglobinkonzentration (c):

$$c \text{ (g/100 ml)} = E_{\text{Probe}} \times 36,8$$

⁺ Merckotest, Firma Merck Darmstadt

3.7 Cholesterinbestimmung im Plasma

Cholesterin-Esterase spaltet die im Plasma vorhandenen Cholesterinester in Cholesterin und Fettsäuren.

Das freie Cholesterin wird durch Cholesterin-Oxidase unter Sauerstoffverbrauch zu Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt.

Wasserstoffperoxid bildet unter Einwirkung der Peroxidase mit Phenol und Aminophenazon einen roten Farbstoff. Die Intensität dieses Farbstoffs ist der Cholesterinkonzentration im Plasma direkt proportional und wird spektralphotometrisch gemessen (33) (62).

<u>Reagenzlösung:</u> ⁺	(Endkonzentrationen im Ansatz)
Phosphatpuffer	200 mmol/l
4-Aminophenazon	1 mmol/l
Phenol	5 mmol/l
3,4 Dichorphenol	5 mmol/l
Fettalkoholpolyglycoläther	0,48 %
Cholesterin-Esterase	0,1 U/ml
Cholesterin-Oxidase	0,14 U/ml
Peroxidase	0,12 U/ml

20 μ l Plasma (Plasmagewinnung siehe 3.1) wurden jeweils mit 2 ml Reagenzlösung versetzt und bei 37° C inkubiert.

Nach 15 min wurde die Extinktion der Probe bei Hg 546 nm gegen den Leerwert (enthält 2 ml Reagenzlösung) gemessen.

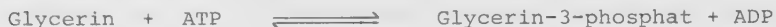
Aus diesem Extinktionswert wurde die Cholesterinkonzentration (c) in mmol/l errechnet:

$$c = E_{\text{Probe}} \times 23,9$$

⁺ monotest Cholesterin, Boehringer GmbH, Mannheim

3.8 Triglyzeridbestimmung im Plasma

Triglyzeride werden durch die Enzyme Lipase und Esterase gespalten. Das freigesetzte Glycerin wird unter der katalytischen Wirkung von Glycerokinase durch ATP phosphoryliert.



Das entstandene ADP wird durch Phospho-Enol-Pyruvat mittels Pyruvatkinase in ATP und Pyruvat umgesetzt.



Pyruvat wird unter NADH-Verbrauch durch das Enzym LDH zu Lactat hydriert.



Der NADH-Verbrauch ist der Glycerinmenge äquivalent und wird als Extinktionsabnahme photometrisch gemessen (64) (70).

Reagenzien:⁺

- 1) 50 mM Phosphatpuffer; 4 mM Magnesiumsulfat, 0,35 mM Natrium-Dodecylsulfat
- 2) 10 mM NADH, 22 mM ATP, 18 mM PEP
- 3) LDH 300 U/ml, PK 50 U/ml, Lipase 4000 U/ml, Esterase 30 U/ml
- 4) GK 150 U/ml

Je 1 ml des nach Vorschrift gefertigten Reaktionsgemisches (64) und je 20 µl Plasma (siehe 3.1) wurden in eine Küvette pipettiert, kurz durchmischt und 10 min bei 20° C inkubiert. Anschließend wurde bei Hg 366 nm der Extinktionswert E_1 abgelesen.

Darauf wurden 10 µl Glycerokinase (GK) in den Ansatz pipettiert, wiederum wurden die Proben bei 20° C inkubiert und nach 10 min wurde die Extinktion E_2 abgelesen.

Aus der Differenz der Extinktionswerte ΔE wurde die Triglyzeridkonzentration (c) ermittelt:

$$c \text{ (mmol/l)} = \Delta E \times 15,5$$

⁺ Test-Kombination Triglyzeride, Boehringer GmbH, Mannheim

3.9 Messung des HbA₁-Fraktion des Gesamthämoglobins

Glykosylierung des endständigen Valins der β -Hämoglobinketten führt zu einer Strukturänderung des Proteins und damit zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes (3). Dadurch kann das glykosylierte Hämoglobin (HbA₁) chromatographisch nach der Mikrosäulentechnik an einem schwach sauren Ionenaustauscher vom freien Hämoglobin abgetrennt und anschließend photometrisch bestimmt werden. Nach zusätzlicher Messung des Gesamthämoglobins am Photometer kann aus den Extinktionswerten der prozentuale Anteil des HbA₁ errechnet werden. (41) (63)

Reagenzien:⁺

1) Detergenz	0,1 %
2) Phosphatpuffer-Lösung	40 mmol/l pH 6,7
3) Natriumchlorid-Lösung	400 mmol/l

Mikrosäulen

Kationenaustauscherharz ca.1 g/Säule

Die Blutproben der einzelnen Probanden mußten zunächst hämolytisiert werden. Dazu wurden jeweils 0,2 ml Detergenz und 0,05 ml Blut in ein Reagenzglas pipettiert und 10 min inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Proben mehrmals gut geschüttelt.

Zur Bestimmung des HbA₁ pipettierte man dann jeweils 0,05 ml des hergestellten Hämolysats auf die Fritte der vorbereiteten Mikrosäulen (63) (Arbeitstemperatur 23° C). Nach vollständigem Einsickern des Hämolysats wurde mit 0,2 ml Phosphatpufferlösung nachgewaschen und das Eluat verworfen. Darauf wurden 4 ml

⁺ Test-Kombination HbA₁, Boehringer GmbH, Mannheim

Puffer auf die Fritte pipettiert und das abtropfende Eluat wurde vollständig gesammelt. (Tropfgeschwindigkeit 6/min, Zeitbedarf ca. 30 min). Anschließend wurde die Extinktion E_1 des Eluats bei Hg 405 nm am Photometer gegen Wasser gemessen.

Zur Bestimmung des Gesamthämoglobins wurden jeweils 0,05 ml Hämolysat, 4 ml NaCl-Lösung und 15 ml Aqua dest in ein Reagenzglas pipettiert. Die einzelnen Proben wurden gut durchmischt, dann konnte die Extinktion des Gesamthämoglobins E_g am Photometer bei Hg 405 nm abgelesen werden (Messung gegen Wasser).

Aus den beiden Extinktionswerten wurde jeweils der HbA₁-Wert ermittelt:

$$\% \text{ HbA}_1 = \frac{E_1}{4,7 \times E_g} \times 100$$

4. ERGEBNISSE

4.1 Messung der Insulinaseaktivität

Die insulinresistenten Diabetiker zeigten von allen untersuchten Gruppen die höchste spezifische Insulinaseaktivität (Berechnung siehe 3.2.4). Der Durchschnittswert dieser Gruppe betrug $108,2 \pm 8,8$ mU/mgHb. Die Typ I und insulinbehandelten Typ II Diabetiker hatten mit $85,3 \pm 5,6$ mU/mg Hb und $85,6 \pm 10,1$ mU/mg Hb beinahe identische Ergebnisse, die nur wenig höher waren als die des Normalkollektivs mit $78,8 \pm 3,8$ mU/mg Hb. (siehe Abb. 3)

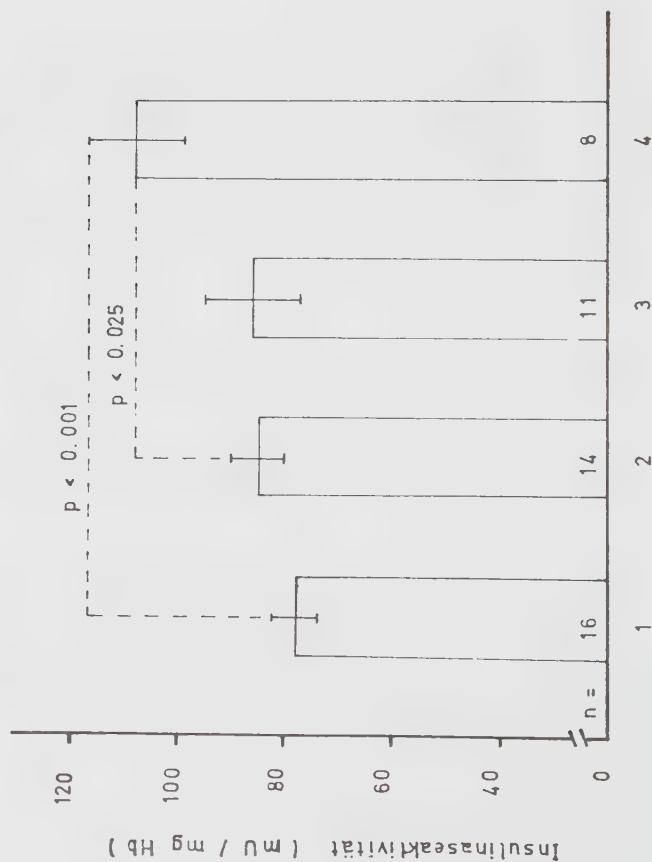
In Abbildung 4 sind zum Vergleich die Abbauraten (% Abbau/min) einer Kontrollperson und eines insulinresistenten Probanden dargestellt.

Bei beiden betrug der Hb-Gehalt im Hämolysat 14,4 mg/ml und die spezifische Insulinaseaktivität entsprach jeweils dem errechneten Durchschnittswert der zugehörigen Gruppe.

Überprüfte man die Mittelwerte der einzelnen Kollektive mit einem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben (57), so konnte zwischen der Kontrollgruppe und den Typ I sowie den insulinbehandelten Typ II Diabetikern kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Vergleich der gesunden Personen mit den insulinresistenten Diabetikern ergab jedoch einen deutlich signifikanten t-Wert, $t = 3,82$, $p < 0,001$.

Ebenso unterschieden sich die Durchschnittswerte zwischen Typ I und insulinresistenten Diabetikern signifikant auf dem 2,5 % Niveau mit $t = 2,424$.

Abb. 3 spezifische Insulinaseaktivität



Mittelwerte $\pm$ SEM

1 gesunde Kontrollgruppe

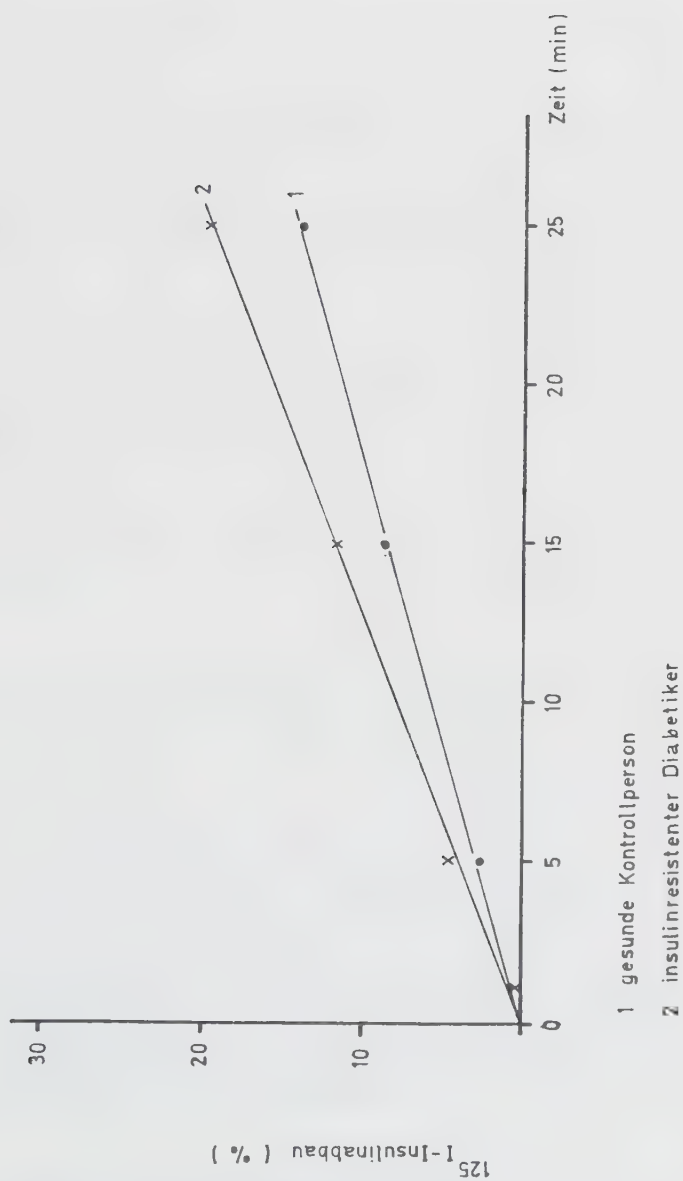
3 insulinbeh. Typ II Diabetiker

2 Typ I Diabetiker

4 insulinresistente

Diabetiker

Abb. 4 Vergleich zweier Abbauraten



4.2 Ergebnisse des Insulinbindungstestes an Erythrozyten

Aus den Einzelwerten der spezifischen Bindung (%) (Rechen-schema siehe 3.3.4) wurde für jedes Kollektiv die durchschnittliche Bindungskurve erstellt. (Abb. 5)

Wie daraus zu entnehmen ist, zeigten die Typ I und Typ II Diabetiker die höchsten Bindungswerte, die Ergebnisse der insulinresistenten Diabetiker waren geringfügig niedriger als die des Normalkollektivs.

Zusätzlich wurde aus dem jeweils höchsten Bindungsergebnis der einzelnen Probanden für jede Gruppe der Mittelwert der maximalen ^{125}J -Insulinbindung errechnet (Abb. 6). Dabei bestand in der Gruppe der insulinresistenten Diabetiker zwischen den einzelnen Maximalwerten eine große Differenz (4 - 9,8 %).

Die Auswertung des t-Testes erbrachte auf dem 5 % Signifikanzniveau keine Unterschiede zwischen den Durchschnittswerten der untersuchten Kollektive.

Nach SCATCHARD (20) (59) wurde für jedes einzelne Kollektiv die Rezeptorenzahl bzw. die Bindungskapazität R_0 ($\mu\text{E}/\text{ml}$) graphisch ermittelt, indem gebundenes / freies Insulin (b/f) gegen gebundenes (b) aufgetragen wurde (siehe Abb. 7; Abszissenschnittpunkt = R_0).

R_0 der Normalpersonen betrug $24 \mu\text{E} = 0,96 \text{ ng}$ und hatte damit etwa denselben Wert wie bei (2). Dagegen war R_0 in allen diabetischen Gruppen erniedrigt, besonders bei den insulinresistenten Diabetikern mit $15 \mu\text{E} = 0,60 \text{ ng}$.

Mit Hilfe der Bindungskapazität wurde nach DE MEYTS (12) die durchschnittliche Affinität der Insulinrezeptoren $\bar{K}$ (b/f) / ($R_0 - b$) bestimmt, die von einem Wert K_e bei unbesetzten Re-

zeptoren auf den Betrag von K_f bei vollbesetzten Rezeptoren abnimmt.⁺

Die einzelnen Affinitätsprofile (Abb. 8) zeigten bei 0,4 % Rezeptorbesatz $\bar{Y}$ (b/R_0) in allen diabetischen Gruppen eine höhere K_e als in der Kontrollgruppe. K_e der Typ I Diabetiker war größer als die der insulinresistenten und Typ II Diabetiker. K_f wurde in allen Gruppen bei 60 - 70 % Rezeptorenbesatz erreicht. Wiederum lag K_f der Diabetiker über dem Wert der Normalpersonen.

Schließlich wurde als Maß der Affinität zusätzlich zu $\bar{K}$ die ID_{50} ermittelt (4) (18). Dies ist die benötigte unmarkierte Insulinkonzentration, um die maximale ^{125}J -Insulinbindung auf 50 % zu reduzieren.

Gegenüber $\bar{K}$ kann dieser Wert direkt aus den einzelnen Bindungskurven abgelesen werden und ist somit zwischen jedem Probanden vergleichbar.

Für die untersuchten Kollektive wurden folgende Mittelwerte errechnet:

	benötigte Insulinmenge ($\mu E/ml$)
Kontrollpersonen (n = 16)	$50,6 \pm 6,8$
Typ I Diabetiker (n = 14)	$36,5 \pm 4,5$
insulinbehandelte Typ II Diabetiker (n = 11)	$63,2 \pm 16,8$
insulinresistente Diabetiker (n = 8)	$59,1 \pm 13,4$
Mittelwerte $\pm$ SEM	

Die erforderliche Insulinmenge erschien zwar bei den Typ I Diabetikern gegenüber den anderen Gruppen deutlich niedriger und die Affinität damit höher, dennoch ergab der t-Test keine signifikanten Unterschiede.

Ebenso waren beim Vergleich der Mittelwerte der übrigen Kollektive keine signifikanten t-Werte festzustellen.

⁺ (DE MEYTS setzt bei der Berechnung von $\bar{K}$ eine negative Kooperation der Liganden am Insulinrezeptor voraus.)

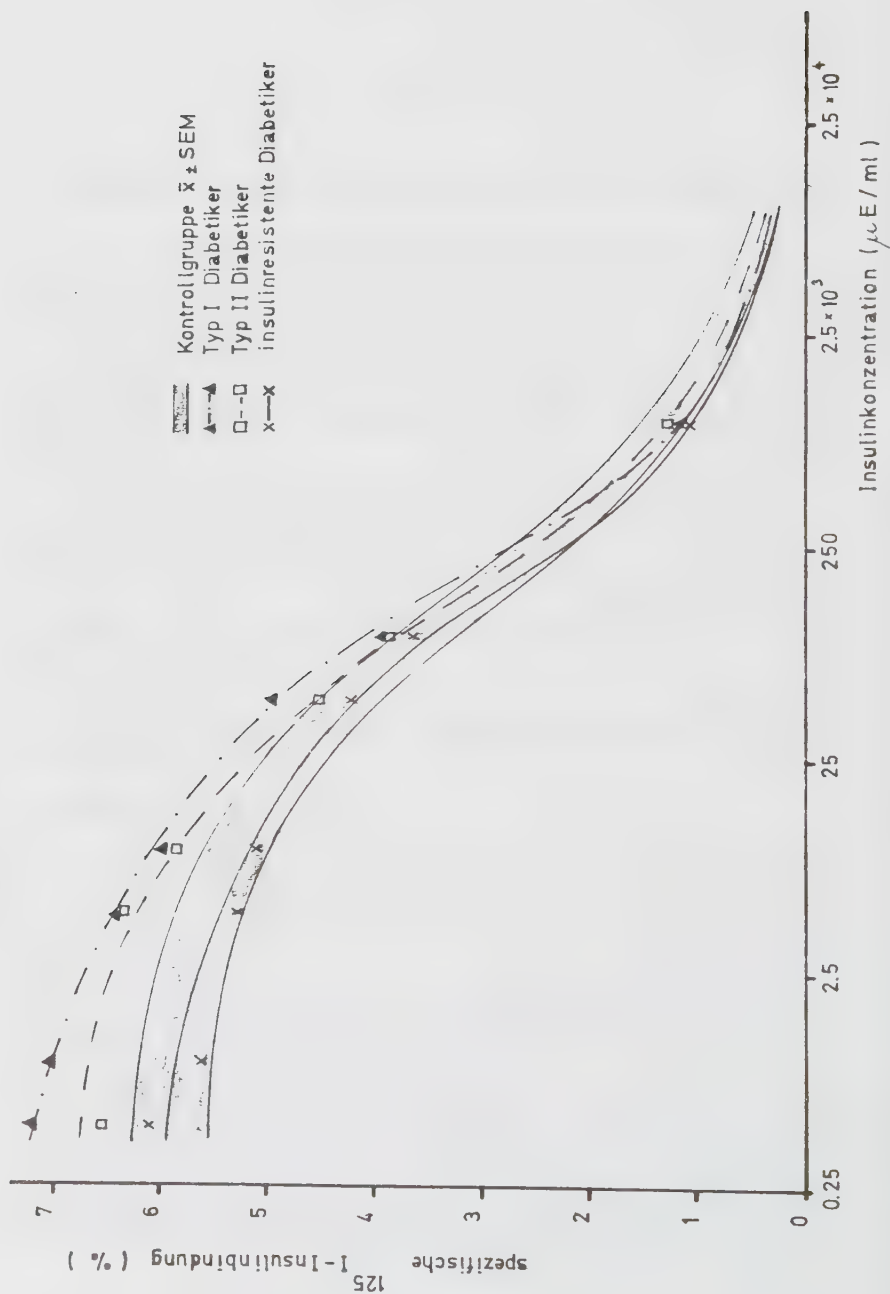


Abb. 6 maximale spezifische Insulinbindung an Erythrozyten

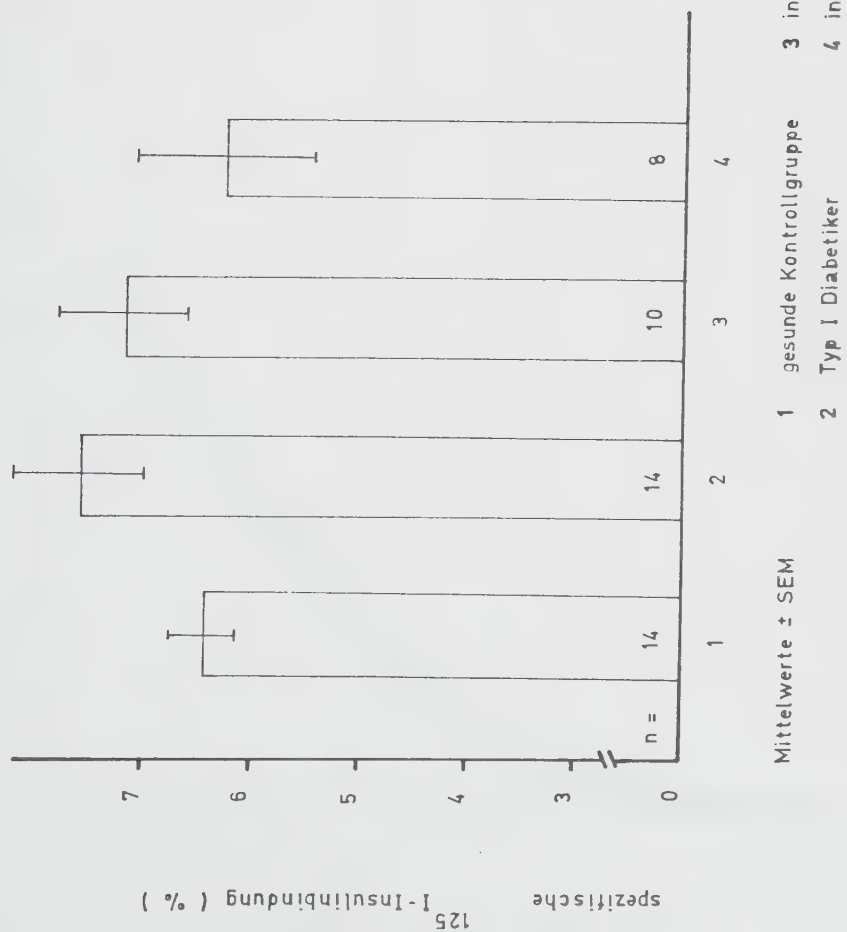


Abb. 7 SCATCHARD - Analyse der Bindungsdaten

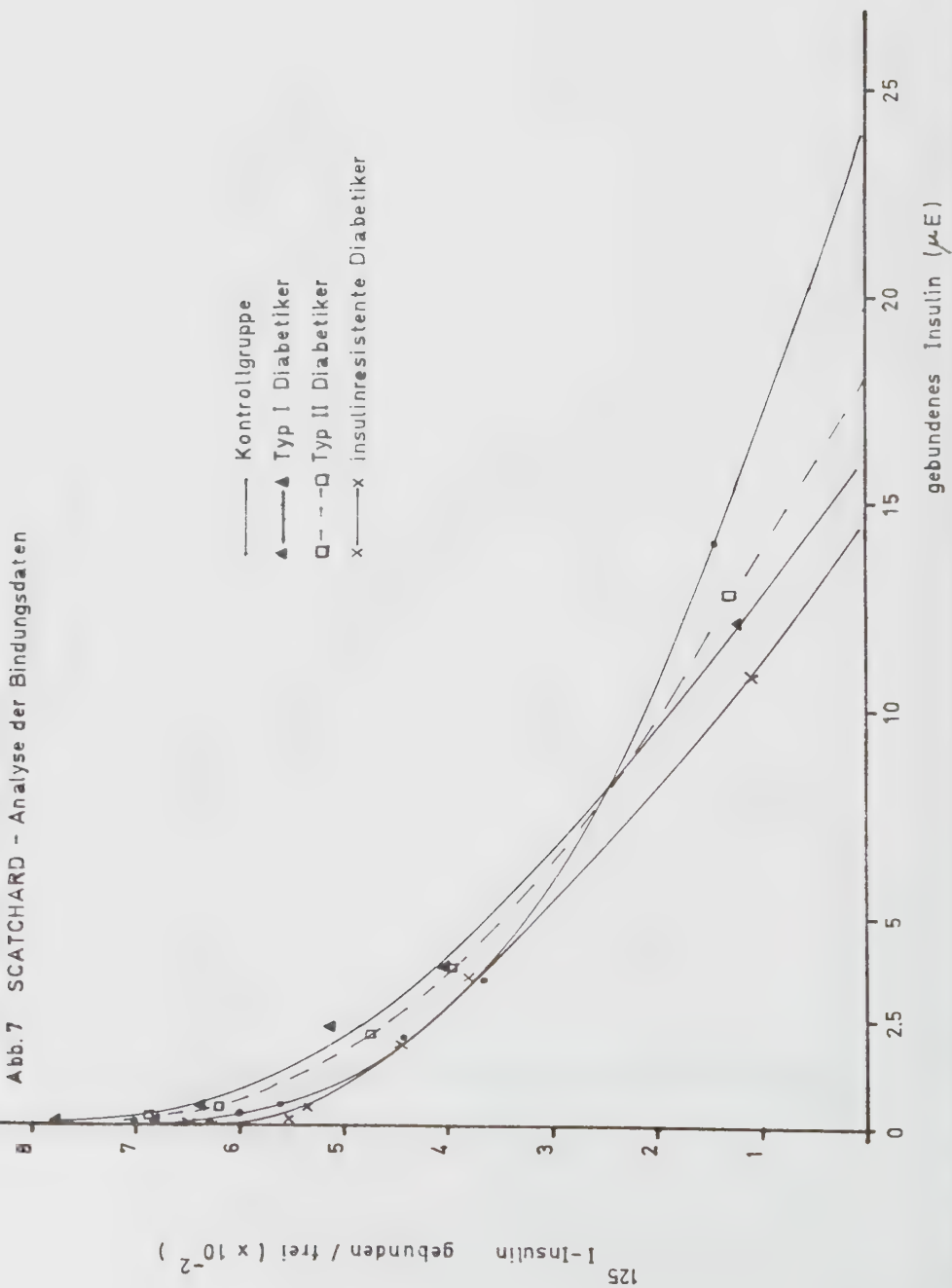
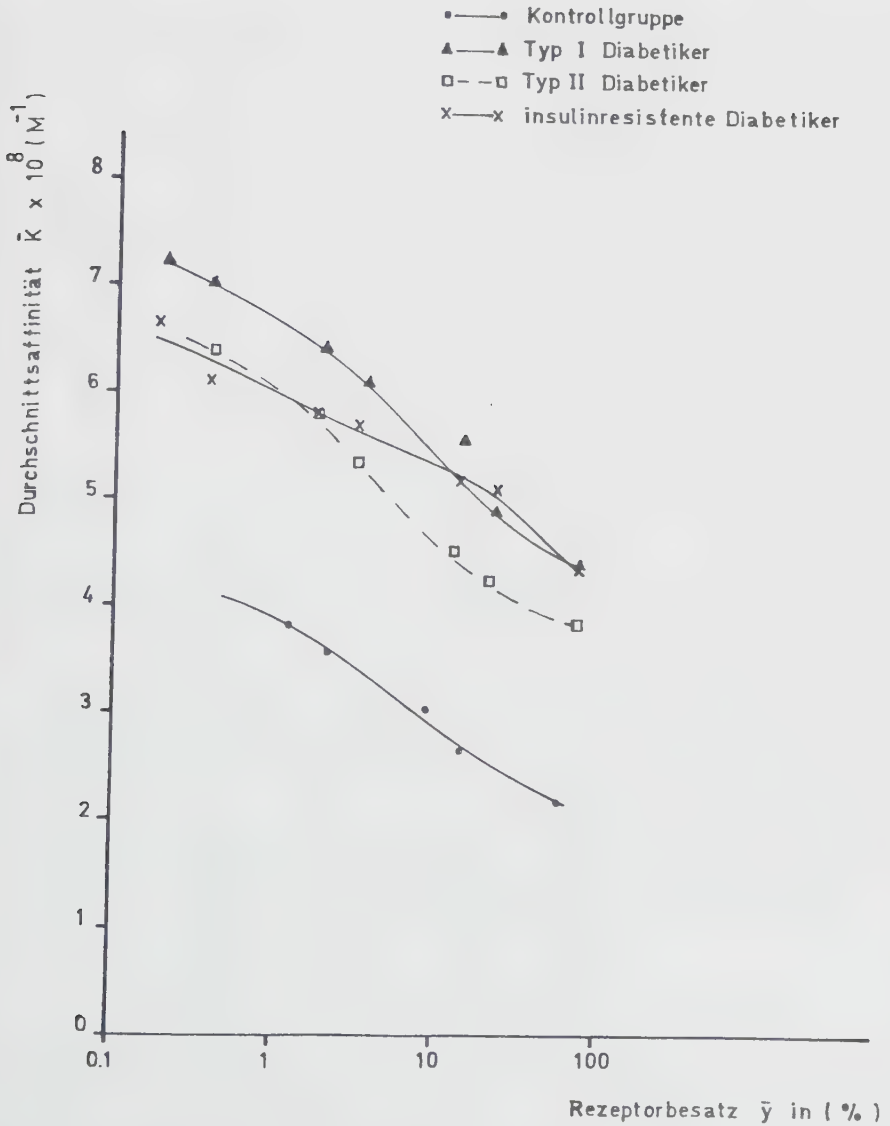


Abb. 8 Affinitätsprofile nach DE MEYTS



4.3 Auswertung der Insulin- und Insulinantikörperbestimmung

Der unter 3.4 beschriebene Radioimmunassay erfaßte die freie immunoreaktive Insulinkonzentration im Plasma der einzelnen Probanden.

In allen diabetischen Gruppen lagen die gemessenen Nüchterninsulinspiegel über dem Mittelwert des Normalkollektivs mit 9,8 $\mu\text{E/ml}$.

Der Durchschnittswert der Typ II Diabetiker war mit 16,5 $\mu\text{E/ml}$ beinahe doppelt so hoch, der Wert der Typ I Diabetiker betrug 23,2 $\mu\text{E/ml}$ und die insulinresistenten Diabetiker zeigten mit 40,2 $\mu\text{E/ml}$ eine deutliche Hyperinsulinämie.

Der t-Test für unverbundene Stichproben ergab auf dem 2,5 % Niveau signifikante t-Werte zwischen allen Gruppen außer den Typ I Diabetikern verglichen mit Typ II Diabetikern $t = 2,42$, $p < 0,05$. (siehe Tab. 2)

Der t-Wert der Kontrollpersonen gegen Gruppe 3 und 4 erreichte sogar $p < 0,001$.

Die errechnete Antikörperaktivität in % ^{125}J -Insulinbindung an γ -Globuline betrug in den diabetischen Kollektiven im Durchschnitt 60 %.

4 Patienten der Gruppe 2 hatten eine Bindungskapazität von mehr als 65 %, ebenso 1 Diabetiker der Gruppe 3 und 2 der Gruppe 4.

Diese Personen wurden bei der Berechnung des durchschnittlichen Insulingehalts der einzelnen Kollektive nicht berücksichtigt.

Jedoch zeigte keiner dieser Probanden abweichende Ergebnisse des Insulinbindungs- und Insulinabbautestes innerhalb der jeweils zugehörigen Patientengruppe.

Tab. 2: Nüchterninsulinspiegel im Plasma und Signifikanzwerte
Mittelwerte $\pm$ SEM

Gruppe	Insulin (μ E/ml)	t-Werte	Signifikanzniveau
1 Kontrollpersonen	9,8 $\pm$ 1,2	gegen Gruppe 2: t = 4,85 Gruppe 3: t = 2,70 Gruppe 4: t = 6,47	gegen alle Gruppen p < 0,02
2 Typ I Diabetiker	23,2 $\pm$ 3,0	gegen Gruppe 1: t = 4,85 Gruppe 3: t = 2,42 Gruppe 4: t = 2,59	gegen Gruppe 3 + 4 p < 0,025
3 Insulinbehandelte Typ II Diabetiker	16,5 $\pm$ 2,6	gegen Gruppe 1: t = 2,70 Gruppe 2: t = 2,42 Gruppe 4: t = 3,67	gegen Gruppe 1 + 4 p < 0,02
4 Insulinresistente Diabetiker	40,2 $\pm$ 7,0	gegen Gruppe 1: t = 6,47 Gruppe 2: t = 2,59 Gruppe 3: t = 3,67	gegen alle Gruppen p < 0,025

4.4 Korrelationen der einzelnen Versuche

Zwischen der Plasmainsulinkonzentration und der maximalen ^{125}J -Insulinbindung an die Erythrozyten wurde in keiner Gruppe eine signifikante Korrelation festgestellt.

Die Bindungsergebnisse der Typ I und Typ II Diabetiker verhielten sich dabei invers zur vorhandenen Insulinkonzentration.

Ebenso bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Insulingehalt und der Rezeptoraffinität ($= \mu\text{E Insulin bei } 1/2 \text{ maximaler Bindung, siehe 4.2}$).

Die Korrelation mittlerer Insulinspiegel zu mittlerer Bindungskapazität betrug für die 4 Gruppen zusammen $r = -0,849$, erreichte damit aber noch nicht das erforderliche 5 % Signifikanzniveau.

Auch zwischen Rezeptoraffinität und Insulinabbau konnte in keiner Gruppe eine signifikante Abhängigkeit ermittelt werden.

Dagegen war der Insulinspiegel signifikant korreliert mit dem Insulinabbau in drei der untersuchten Gruppen außer den insulinresistenten Diabetikern ($r = -0,36$). Dabei war die Korrelation bei den insulinbehandelten Typ II Diabetikern invers. Für die einzelnen Kollektive errechnete man folgende Werte:

Kontrollpersonen (n=16): $r = 0,61, y = 1,86 x + 62,82, p < 0,05$

Typ I Diabetiker (n=10): $r = 0,65, y = 1,20 x + 51,84, p < 0,05$

Typ II Diabetiker (n= 9): $r = -0,89, y = -3,22 x + 133,74, p < 0,05$

Die Gesamt-Korrelation der beiden erstgenannten Gruppen betrug:

(Abb. 9) (n=26): $r = 0,41, y = 0,72 x + 69,98, p < 0,05$

Ferner wurde in der Kontrollgruppe und der Gruppe der insulin-behandelten Typ II Diabetiker eine signifikante Abhängigkeit zwischen Insulinbindung und -abbau gefunden:

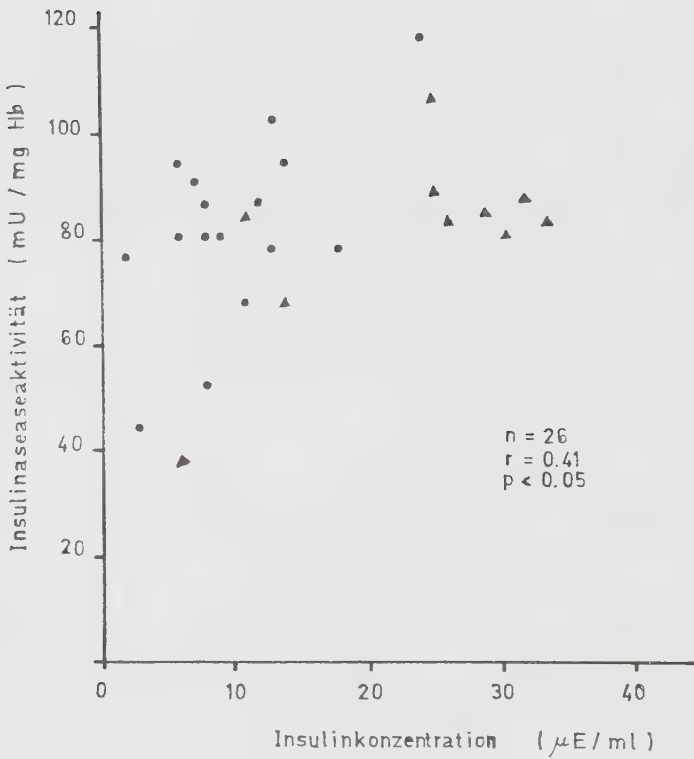
Kontrollpersonen (n=16): $r = 0,59$, $y = 5,49 x + 44,88$, $p < 0,05$

Typ II Diabetiker (n=10): $r = 0,79$, $y = 13,80 x - 11,18$, $p < 0,01$

Schließlich bestand für alle untersuchten Kollektive ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Produkt aus Insulinkonzentration und Bindungskapazität R_0 und dem gemessenen Insulinabbau:

(n = 4): $r = 0,97$, $y = 2,01 x + 59,32$, $p < 0,05$.

Abb.9 Korrelation von Insulinkonzentration
mit Insulinaseaktivität



- Kontrollgruppe
- ▲ Typ 1 Diabetiker

5. DISKUSSION

5.1 Insulinaseaktivität der untersuchten Gruppen

Von allen untersuchten Kollektiven hatten die insulinresistenten Diabetiker die höchste Insulinaseaktivität.

In der Literatur wurde bisher nur in wenigen Arbeiten über einen erhöhten Insulinabbau bei insulinresistenten Patienten berichtet, obwohl dies schon lange als theoretische Ursache der Insulinresistenz diskutiert wurde.

So fanden PAULSEN (49), KITABCHI (32) und MABERLY (40) einen verstärkten Insulinabbau im Muskel- oder Fettgewebe einiger extrem insulinresistenter Diabetiker. Ferner konnten Müller (44), Mc ELDUFF (42) sowie MISBIN (43) eine Verbindung zwischen Insulinresistenz und Insulinabbau aufzeigen.

Die hier beschriebene Insulinase wurde von KOLB und STANDL (34) (35) aus dem Cytosol menschlicher Erythrozyten isoliert. Das gereinigte Enzym ist homogen, hat ein Molekulargewicht von 150000 - 160000 und besteht aus 4 identischen Untereinheiten. Es handelt sich dabei um eine Protease, deren katalytische Aktivität von Sulfhydrylgruppen abhängig ist. Im Gegensatz zu anderen insulinabbauenden Enzymen, wie Gluthathion-Transhydrogenasen (1) (69), baut diese Protease Insulin in physiologischen Konzentrationen mit hoher Spezifität ab. So spaltet 1 mg des gereinigten Enzyms 50 pmol Insulin/min (35). Andere Proteohormone werden von der Insulinase nicht abgebaut.

Als Spaltprodukte wurden Peptide, die kleiner als die A-Kette des Insulins sind, chromatographisch nachgewiesen. Die Enzymaktivität konnte durch verschiedene Proteaseinhibitoren gehemmt werden. Beide Befunde bestätigten den proteolytischen Charakter des Enzyms. (34) (35)

Die Insulinase hat damit ähnliche Eigenschaften wie insulinabbauende Proteasen in insulin sensitiven Geweben von Tieren (10) (74), obwohl die untersuchten Erythrozyten kein eigentlicher Wirkungsort des Insulins sind. Von besonderem Interesse ist die Ähnlichkeit der Insulinase mit der von NEAL (45) isolierten insulinabbauenden Protease aus menschlicher Skelettmuskulatur.

Die Messung der Insulinaseaktivität in dieser Arbeit (siehe auch Methoden 3.2) erfolgte im physiologischen pH-Bereich und damit im untersuchten pH-Optimum des Enzyms (34) (60). Mehrere Messungen des Testansatzes ergaben vor ^{125}J -Insulinzugabe einen pH-Wert von 7,3. Ebenso wurde auf die genaue Einhaltung der Versuchstemperatur von 37° C geachtet. Bei dieser Temperatur war für die Insulinase eine Thermostabilität über einen Reaktionsablauf von mindestens 30 Minuten nachgewiesen (60) (Testzeit hier 25 min).

Während der gesamten Inkubationszeit zeigte die Protease eine lineare, zeitabhängige Kinetik mit kontinuierlicher Zunahme der meßbaren Radioaktivität, d. h. der Insulinabbauprodukte (siehe Abb. 2 und 4).

Diese Spaltprodukte wurden nach der Trichloressigsäure-Methode (34) bestimmt, bei der intaktes Insulin und wohl auch das initial gespaltene Insulin ausgefällt werden, während die durch Insulinase weiter gespaltenen Bruchstücke trichloressigsäurelöslich sind. Durch chromatographische Untersuchungen mit Sephadex ist die Löslichkeit der Spaltprodukte in Trichloressigsäure ebenso wie die vollständige Umwandlung des Insulins in diese Peptide nachgewiesen (34) (35). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß zu Reaktionsbeginn der Insulinaseaktivität größere Spaltprodukte entstehen, die sich in der Sephadex-Chromatographie nicht vom Insulin unterscheiden und mit der Trichloressigsäure-Methode nicht zu erfassen sind, weil sie

mitausgefällt werden (45). Dieser Fehler dürfte aber die Messungen der Insulinaseaktivität kaum beeinträchtigt haben, da die Enzymaktivität aus den mit der Reaktionsdauer zunehmenden trichloressigsäurelöslichen Spaltprodukten, bzw. ihrer Radioaktivität und der daraus errechneten Regressionsgeraden ermittelt wurde.

Eine Erhöhung der Enzymaktivität durch Effektoren mit freien SH-Gruppen, wie Gluthathion, war ebenfalls ausgeschlossen, da der Testansatz eine 1 mM Jodacetamidlösung enthielt (34) (60). Um jeglichen Aktivitätsverlust durch längere Lagerung zu vermeiden, wurde der Abbaustest jeweils unverzüglich nach der Blutentnahme durchgeführt.

Außerdem waren in einer Untersuchung von SCHNEIDER (60) an über 150 Personen weder alters- noch geschlechtsabhängige Unterschiede in der Insulinaseaktivität festgestellt worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde keine unterschiedliche Enzymaktivität zwischen Normalpersonen und gut eingestellten Typ I sowie gut eingestellten insulinbehandelten Typ II Diabetikern gefunden. Im Gegensatz dazu war, wie anfangs erwähnt, der Insulinabbau der insulinresistenten Patienten (tägl. Insulindosis 92 ± 5 E) im Vergleich zu den übrigen Gruppen deutlich erhöht (siehe Abb. 3). Bei keinem dieser Patienten waren erhöhte Mengen von Insulin neutralisierenden Antikörpern im Plasma nachzuweisen (siehe 4.3).

Als weiteres Ergebnis konnte in dieser Arbeit, wenn auch nur statistisch errechnet, ein Zusammenhang sowohl zwischen Insulinbindung und -abbau als auch zwischen vorhandenem Plasmainsulin und Insulinabbau festgestellt werden, insbesondere in der gesunden Kontrollgruppe. Ebenso waren Insulinspiegel und Insulinaseaktivität bei den Typ I und insulinbehandelten Typ II Diabetikern signifikant korreliert, in der letztgenannten Gruppe war die Korrelation jedoch invers.

Auch in der Literatur findet man Hinweise zu diesen Korrelationen. So beobachtete DUCKWORTH (16) an hypoinsulinämischen, streptozotocin-diabetischen Ratten einen vermehrten Insulinabbau im Muskelgewebe bei gleichzeitig erhöhter Insulinbindung. Beide Befunde waren nach einwöchiger Insulinbehandlung voll reversibel. Ferner konnte KITABCHI (32) bei insulinresistenten Diabetikern im Muskel- und Fettgewebe eine positive Korrelation des basalen Insulinspiegels mit dem Insulinabbau aufzeigen, wobei der vermehrte Abbau als Folge der Hyperinsulinämie interpretiert wurde. Alle beschriebenen Befunde deuten darauf hin, daß die Aktivität der insulinabbauenden Enzyme ein induzierbarer Mechanismus ist, durch den der Insulinstoffwechsel bzw. die biologische Insulinwirkung in den entsprechenden Zielzellen beeinflusst wird. Dabei ist sowohl im Zustand des Insulinmangels als auch der Insulinresistenz eine erhöhte Enzymaktivität nachzuweisen, während eine ausgeglichene Stoffwechselsituation mit einer normalen Enzymaktivität einhergeht.

Wenn auch die vorliegenden Abbauergebnisse mit den in der Literatur beschriebenen Befunden übereinstimmen, so muß dennoch berücksichtigt werden, daß die Insulinaseaktivität in Erythrozyten und unter in vitro Bedingungen gemessen wurde. Die gefundenen Abbauraten müssen daher nicht unbedingt den in vivo Verhältnissen entsprechen, besonders in insulinsensitiven Geweben.

Nähere Aufschlüsse über den Insulinabbau und ob er von primärer oder sekundärer Bedeutung in der Entstehung der Insulinresistenz bei Typ II Diabetikern ist, bleiben in vivo Studien vorbehalten. Dabei könnte der Insulinabbau zunehmend an Interesse gewinnen, nachdem mehrere Autoren (6) (37) (48) (56) die Vorrangigkeit der Postrezeptordefekte in der Resistenzentwicklung bei Typ II Diabetikern nachweisen konnten und damit die bisher angenommene Bedeutung der Rezeptorebene relativiert wurde. Es

konnte aber auch gezeigt werden, daß eine ausreichende Insulinbehandlung diese Postrezeptordefekte verringerte und sich somit metabolische Effekte des Insulins, z. B. die Glukoseverwertung der Zellen verbesserten. (58)

Schließlich lieferten neuere Untersuchungen der Insulin-Clearance interessante Anhaltspunkte zur Insulinsensitivität bzw. Insulinresistenz. In mehreren in vivo Studien wurde bei Diabetes eine gegenüber der normalen Stoffwechsellage abweichende (19) (46) (52), jedoch wieder veränderliche (52) Insulin-Clearance festgestellt. So beobachtete PHILIPPE (52) an streptozotocin-diabetischen Ratten eine erhöhte Clearance-Rate, die sich nach Insulintherapie normalisierte. Anhand seiner Tracer-Studien mit ^3H -Insulin führte er die zuerst erhöhte Insulin-Clearance auf eine vergrößerte Bindungskapazität der Zellen mit nachfolgend beschleunigtem Insulinabbau zurück. Diese Befunde sind damit mit den in vitro Ergebnissen von DUCKWORTH (16) vereinbar. Ebenso erbrachten die Clearance-Untersuchungen bei verschiedenen diabetischen Zuständen am Menschen (19) (46) Hinweise auf eine rezeptorvermittelte Insulin-Clearance, was ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen Insulin-Clearance, Insulinbindung und Insulinsensitivität der Gewebe schließen läßt.

5.2 Insulinbindung

Wie von vielen Autoren nachgewiesen wurde, ist der erste Schritt der Insulinaktion die Bindung an spezifische Membranrezeptoren (5) (26) (65). Ebenso wurde in zahlreichen Studien eine reduzierte Insulinbindung bei insulinresistenten Typ II Diabetikern beschrieben. (13) (30) (47)

Untersuchte man nun in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zum Insulinabbau im Erythrozytenhämolysat die Insulinbindung an die intakte Erythrozytenmembran, so war im Gegensatz zur Messung der Insulinaseaktivität bei den Bindungsergebnissen in der Gruppe der insulinresistenten Diabetiker keine eindeutige Aussage möglich.

Der hier verwendete Receptorassay wurde als kompetitive Bindungsanalyse nach den Angaben von GAMBHIR (20) durchgeführt. Eine methodische Schwierigkeit des Testes lag darin, jede Beschädigung der Erythrozytenmembranstruktur und damit der Rezeptorfunktion zu vermeiden, die zu falschen Meßergebnissen führen könnte. Deshalb wurden die heparinisierten Blutproben unverzüglich bei niedriger Temperatur in das Labor transportiert und dort sofort weiterverarbeitet. Aus demselben Grund wurde während der Probenvorbereitung auf die strenge Einhaltung der niedrigen Drehzahl bei allen erforderlichen Zentrifugationen geachtet.

Ferner versuchte man die Stabilität des eingesetzten Puffers G durch Lagerung bei -20°C in gebrauchsfertigen Portionen zu verbessern (siehe Methoden 3.3.1).

Ein weiterer Störfaktor war die notwendige Abtrennung anderer Blutzellen wie Leukozyten, Lymphozyten aber auch Retikulozyten vom eigentlichen Erythrozytengemisch. Dazu wurden die Blutproben mit Ficoll-Paque nach BOYUM (7) zentrifugiert. Nach jeder Zentrifugation mußte der Überstand gründlich abgesaugt werden

einschließlich der obersten Blutzellschicht, um die darin vorhandenen Retikulozyten möglichst vollständig zu entfernen (siehe 3.3.1).

Schließlich konnten die Meßergebnisse auch durch die Trennung der freien von der gebundenen Insulinfraktion am Ende des Testablaufes beeinträchtigt werden. Nach der Originalmethode (20) wurde das freie Insulin zunächst abgesaugt und dann die Erythrozytenschicht mit dem gebundenen Insulin abgetrennt. Hier wurde versucht, durch eine Vereinfachung dieses Vorgangs mit sofortiger Durchtrennung der Reaktionsgefäße in Höhe der zentrifugierten Erythrozytenschicht (Details siehe 3.3.3) diese Fehlerquelle zu reduzieren.

Die hohe Spezifität des Testes zeigte sich an der niedrigen unspezifischen Bindung von ca. 1,5 %, ebenso lag die erforderliche ID_{50} , d. h. die benötigte Menge nativen Insulins, um die maximale Bindung auf die Hälfte zu reduzieren, im Bereich physiologischer Insulinkonzentrationen (siehe 4.2).

Für die Mittelwerte der maximalen Insulinbindung konnte zwischen der Kontrollgruppe und allen diabetischen Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 5 und 6). Zwischen den Einzelergebnissen der resistenten Diabetiker bestand aber eine große Differenz, 2 Patienten hatten eine eindeutig erniedrigte Bindung (4 %), ohne daß diese Werte erhöhten Antikörpern oder einem extremen Hyperinsulinismus zuzuordnen waren.

Die Maximalwerte der Normalpersonen waren mit den Ergebnissen anderer Studien (2) (14) vereinbar. Ebenso wurde in der Literatur von PRAGER (55) und PEDERSEN (51) bei gut eingestellten Typ I Diabetikern eine normale Insulinbindung an Erythrozyten beschrieben.

Jedoch können die an Erythrozyten gewonnenen Bindungsergebnisse nicht allgemein auf insulinsensitive Gewebe übertragen werden, da zwischen Leber-, Fett- und Muskelzellen als Zielzellen der Insulinwirkung und den Erythrozyten wesentliche Unterschiede bestehen. So sind rote Blutkörperchen eine heterogene Population, deren Insulinbindung vom Zellalter abhängt (66) (72). ENG (17), DONS (15) und KOSMAKOS (38) konnten eine inverse und sogar eine exponentielle (15) Abhängigkeit der Insulinbindung vom Erythrozytenalter aufzeigen. In diesen Studien konnte nicht nur für Retikulozyten, sondern auch für junge, ausgereifte Erythrozyten eine größere Rezeptorenzahl und damit vermehrte Insulinbindung nachgewiesen werden. Um genaue Aussagen zur Insulinbindung zu bekommen, müßte also das mittlere Zellalter der Erythrozyten bestimmt werden. Dafür gibt es aber weder eine einfache klinische Methode, noch ist die Retikulozytenzahl aussagekräftig genug. Außerdem erbrachte GORDEN (27) (28) mit ^{125}J -Insulin an isolierten Hepatocyten direkte Beweise für eine Aufnahme des Rezeptor-Liganden-Komplexes, d. h. des Insulins in die Zelle durch adsorptive Endozytose. Gleichzeitig wird diesem energieabhängigen Prozeß eine Bedeutung für die Regulation der Rezeptorzahl an der Zelloberfläche zugeschrieben (27). Da aber nur junge Erythrozytenformen die Fähigkeit zur Endozytose besitzen (75), könnte sich somit in der heterogenen Erythrozytenpopulation eine inadäquate Rezeptorregulation ergeben (15) (54). Nach dieser Vorstellung ist auch die durch Insulin selbst bewirkte Reduzierung der Membranrezeptoren, wie sie im Sinne eines Feedback-Mechanismus bei chronischer Hyperinsulinämie von vielen Autoren (22) (36) (61) angenommen wird, an den Erythrozyten unzulänglich, da jeweils nur ein Teil der Zellpopulation zur eigenständigen Rezeptorregulation fähig ist.

Betrachtet man schließlich in der vorliegenden Arbeit die Bindungsparameter Rezeptorzahl R_0 und Affinität K_e , dann sind einerseits die dargestellten Probleme des Rezeptorstatus am Erythrozyten zu berücksichtigen, andererseits ergeben sich methodische Schwierigkeiten, diese Bindungsparameter zu bestimmen. So wird der Wert R_0 graphisch aus einer begrenzt verfügbaren Anzahl von Daten ermittelt und ist damit ungenau (siehe Abb. 7). Dies gilt auch für die errechnete Größe K_e . Wurde deshalb die Affinität direkt aus den Bindungskurven bestimmt, so konnte der für K_e beobachtete Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den diabetischen Kollektiven nicht bestätigt werden (siehe 4.2 und Abb. 8).

Bei der Interpretation aller hier ermittelten Bindungsergebnisse muß jedoch die oben beschriebene Altersabhängigkeit der Insulinbindung in der heterogenen Erythrozytenpopulation berücksichtigt werden. Die Bindungsergebnisse können daher nicht verallgemeinert werden. So ist möglicherweise auch die große Differenz der Einzelergebnisse in der maximalen Insulinbindung bei den insulinresistenten Diabetikern auf einen unterschiedlich hohen Anteil junger Erythrozytenformen in den entsprechenden Inkubationsansätzen zurückzuführen, auch wenn sich aus der Bestimmung der Retikulozytenzahl keine Hinweise dafür ergeben haben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die spezifische Aktivität des insulinabbauenden Enzyms Insulinase im Erythrozytenhämolysat sowie die Insulinbindung an die intakte Erythrozytenmembran gemessen. Zusätzlich wurde die freie Plasmainsulinkonzentration bestimmt. Untersucht wurden - nach einem 12stündigen Fasten - 14 gut eingestellte Typ I Diabetiker, 11 gut eingestellte insulinbehandelte Typ II Diabetiker und 8 insulinresistente Diabetiker, die täglich mehr als 80 Einheiten Insulin benötigten (mittlere Insulindosis 92 ± 5 E/Tag). Die diabetischen Patienten wurden jeweils mit einer Gruppe von 16 gesunden Normalpersonen verglichen. Zur Stoffwechselkontrolle wurden bei den einzelnen Probanden neben dem Nüchternblutzucker, die Cholesterin- und Triglyzeridwerte sowie die HbA_{1c}-Konzentration bestimmt.

Die hier beschriebene Insulinase wurde von KOLB und STANDL aus dem Cytosol menschlicher Erythrozyten isoliert und als Sulfhydrylgruppen-abhängige Protease charakterisiert. Das gereinigte Enzym baut Insulin hochspezifisch in physiologischen Konzentrationen ab und zeigt ähnliche Eigenschaften wie die von NEAL isolierte Protease aus menschlicher Skelettmuskulatur.

Die Messung des Insulinabbaus wurde im Erythrozytenhämolysat nach der Trichloressigsäure-Methode durchgeführt. Dabei wurde die Insulinaseaktivität aus der während der gesamten Reaktionsdauer linearen Zunahme der trichloressigsäurelöslichen Insulinspaltprodukte, bzw. deren Radioaktivität bestimmt. Die spezifische Aktivität wurde auf Hämoglobin bezogen (mU/mg Hb).

Die höchste Abbauaktivität von allen Gruppen hatten die insulinresistenten Diabetiker, deren Insulinresistenz nicht auf erhöhte Mengen von zirkulierenden Insulinantikörpern zurückzuführen war. Die Abbauwerte unterschieden sich signifikant mit $p < 0,001$

zu der Kontrollgruppe und $p < 0,025$ zu den Typ I Diabetikern. In der Literatur wurde ein verstärkter Insulinabbau bisher nur in wenigen Studien im Muskel- oder Fettgewebe bei extrem insulinresistenten Patienten beobachtet, obgleich die Erhöhung der Insulinabbauaktivität schon lange als eine mögliche Ursache der Insulinresistenz diskutiert wurde. Im Gegensatz zu den insulinresistenten Patienten wurde in der vorliegenden Arbeit bei der Insulinaseaktivität zwischen den Kontrollpersonen und den gut eingestellten Diabetikern, sowohl den Typ I als auch den insulinbehandelten Typ II Diabetikern, kein signifikanter Unterschied gefunden.

Darüber hinaus konnte eine signifikante Korrelation zwischen Insulinspiegel und Insulinaseaktivität bei den Kontrollpersonen ($r = 0,61$), den Typ I ($r = 0,65$) und den insulinbehandelten Typ II Diabetikern festgestellt werden. Die Korrelation in der letztgenannten Gruppe war jedoch invers ($r = -0,89$). Ebenso bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen Insulinbindung und -abbau bei den gesunden Probanden ($r = 0,59$) und den insulinbehandelten Typ II Diabetikern ($r = 0,79$). Diese Befunde sind mit Beobachtungen in der Literatur vereinbar, die darauf hinweisen, daß die Insulinabbauaktivität ein induzierbarer Mechanismus ist, durch den der Insulinstoffwechsel in den Zielzellen beeinflußt wird. Dabei ist im Zustand der Insulinresistenz wie auch des Insulinmangels ein erhöhter Insulinabbau zu beobachten.

Die spezifische ^{125}J -Insulinbindung (in %) an die Erythrozytenmembran wurde modifiziert nach GAMBHIR bestimmt. Im Gegensatz zur Insulinaseaktivität wurde bei den maximalen Bindungswerten zwischen den einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt. Die Einzelergebnisse der insulinresistenten Dia-

betiker waren jedoch - trotz normaler Retikulozytenzahlen - nicht einheitlich (4 - 9,8 %).

Als weitere Bindungsparameter wurden die Affinität und die Bindungskapazität der Erythrozyten bestimmt. Die nach DE MEYTS errechnete Affinität K_e der unbesetzten Insulinrezeptoren war bei allen Diabetikern erhöht. Dies bestätigte sich jedoch nicht, wenn die Affinität als ID_{50} (Insulindosis der halbmaximalen Insulinbindung) direkt aus den einzelnen Bindungskurven abgelesen wurde. Zwischen der graphisch ermittelten Bindungskapazität R_0 und dem bei allen diabetischen Patienten erhöhten Insulinspiegel wurde ein inverser Zusammenhang gefunden. Die insulinresistenten Patienten mit der höchsten Hyperinsulinämie hatten die niedrigste Rezeptorenzahl R_0 . Schließlich wurde für alle untersuchten Gruppen eine signifikante Korrelation zwischen dem Produkt aus der Plasmainsulinkonzentration und der Bindungskapazität, und der Insulinaseaktivität errechnet ($r = 0,97$).

Eine physiologische oder pathophysiologische Bedeutung der untersuchten Insulinase ist bisher noch nicht bekannt. Die Insulinabbauwerte wurden an Erythrozyten unter in vitro Bedingungen ermittelt und müssen deshalb nicht notwendigerweise die in vivo Verhältnisse in den eigentlichen Insulinzielgeweben widerspiegeln. Jedoch sind nach neueren Erkenntnissen die Postrezeptordefekte in der Pathogenese der Insulinresistenz bei Typ II Diabetikern vorherrschend. So könnten die hier vorliegenden Ergebnisse auf die mögliche Bedeutung des Insulinabbaus für die periphere Insulinresistenz hinweisen. Nähere Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen Insulinabbau und Resistenzentwicklung, vor allem bei Typ II Diabetikern, bleiben weiterführenden Untersuchungen an klassischen Insulinzielgeweben, z. B. dem Skelettmuskel, vorbehalten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Ansorge S., Bohley P., Kirschke H., Wieanders B., Hanson H. (1973)
Metabolism of insulin and glucagon, glutathione - insulin transhydrogenase from microsomes of rat liver
Eur. J. Biochem. 32: 27 - 35
- 2 Bachmann W., Sieger C., Lacher F., Lotz N. (1981)
Binding of biosynthetic human insulin to erythrocytes of normal and insulin-dependent diabetic subjects: comparison with pork and human pancreatic insulin
Diabetes Care 4: 215 - 219
- 3 Beccaria L., Chiumello G. Gianazza, Luppis B., Righetti P. G. (1978)
Hemoglobin A_{1c} separation by isoelectric focusing
Am J Hematol. 4: 367 - 374
- 4 Beck-Nielsen H., Pedersen O. (1979)
Insulin binding, insulin degradation and glucose metabolism in human monocytes
Diabetologia 17: 77 - 84
- 5 Bellomo G., Bellasszi R., Nicotera P. L., Francesconi R., Frattino (1982)
Binding and degradation of ¹²⁵I-Insulin in human erythrocytes. Comparative studies with hemolysate and membranes
J. Endocrinol. Invest 5: 287 - 291
- 6 Bolinder J., Östman J., Arner P. (1982)
Post-receptor defects causing insulin resistance in normoinsulinemic non-insulin-dependent diabetes mellitus
Diabetes 31: 911 - 916
- 7 Boyum A. (1968)
Separation of leucocytes from blood and bone marrow
Scand J Clin Lab Invest 21: Suppl 97
- 8 Brush J. S., Kitabchi A. E. (1970)
Metabolic disposition of ¹³¹I-iodoinsulin within the rat diaphragm
Bioch Biophys Acta 215: 134 - 144
- 9 Brush J. S. (1971)
Purification and characterization of a protease with specificity for insulin from rat muscle
Diabetes 20: 140 - 145

- 10 Brush J. S., Nascimento C. G. (1982)
Studies of the properties of the insulin protease of rat liver
Bioch Biophys Acta 704: 398 - 402
- 11 Bunn H. F., Gabbay K. H., Gallop P. M. (1978)
The glycosylation of hemoglobin. Relevance to diabetes mellitus
Science 200: 21 - 27
- 12 De Meyts P., Roth J. (1975)
Cooperativity in ligand binding: a new graphic analysis
Biochem Biophys Res Commun 66: 1118 - 1126
- 13 De Pirro R., Fusco A., Lauro R., Testa I., Ferreti F., De Martinis C. (1980)
Erythrocyte insulin receptors in non-insulin-dependent diabetes mellitus
Diabetes 29: 96 - 99
- 14 Dons R. F., Ryan J., Gorden P., Wachslicht-Rodbard H. (1981)
Erythrocyte and monocyte insulin binding in man
A comparative analysis in normal and disease states
Diabetes 30: 896 - 902
- 15 Dons R. F., Corash L. M., Gorden P. (1981)
The insulin receptor is an age-dependent integral component of the human erythrocyte membrane
J Biol. Chem. 256: 2982 - 2987
- 16 Duckworth W. C., Gifford D., Kitabchi A. E., Ryngan K., Solomon S. S. (1979)
Insulin binding and degradation by muscles from streptozotocind diabetic rats
Diabetes 28: 746 - 748
- 17 Eng J., Lee L., Yalow R. S. (1980)
Influence of the Age of Erythrocytes on their Insulin Receptors
Diabetes 29: 164 - 166
- 18 Fantus G., Ryan J., Gorden Ph. (1981)
The insulin receptor in insulin-dependent diabetes mellitus: an in vivo and in vitro study
Metabolism 30: 510 - 517

- 19 Flier J. S., Minaker K. L., Landsberg L., Young J. B., Pallotta J., Rowe J. W. (1982)
Impaired in vitro insulin clearance in patients with severe target cell resistance to insulin
Diabetes 31: 132 - 135
- 20 Gambhir K. K., Archer J. A., Canter L. (1977)
Insulin radioreceptorassay for human erythrocytes
Clin Chem 23: 1590 - 1595
- 21 Gambhir K. K., Archer J. A., Bradley C. J. (1978)
Characteristics of human erythrocyte insulin receptors
Diabetes 27: 701 - 708
- 22 Gavin J. R., Roth J., Neville D. M., De Meyts P., Buell D. (1974)
Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations
A direct demonstration in cell culture
Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 84 - 88
- 23 Gebrauchsinformation Ficoll-Paque
Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Schweden
- 24 Gebrauchsinformation Merckotest: Hämoglobinbestimmung
Merck Diagnostica, Darmstadt
- 25 Gebrauchsinformation RIA-Gnost Insulin (1981)
Behring Werke AG, Marburg
- 26 Gliemann J., Sonne O. (1978)
Binding and receptor mediated degradation of insulin in adipocytes
J. Biol. Chem. 253: 7857 - 7863
- 27 Gorden P., Carpentier J. L., Freychet P., Orci L. (1980)
Internalization of polypeptide hormones
Diabetologia 18: 263 - 274
- 28 Gorden P., Carpentier J. L., Moule M. L., Yip C. C., Orci L. (1982)
Direct demonstration of insulin receptor internalization
A quantitative electron microscopic study of covalently bound ¹²⁵I-photoreactive insulin incubated with isolated hepatocytes
Diabetes 31: 659 - 662

- 29 Herrmann H. J. (1982)
Radioassays in: Nuclearmedizin, Verlag U & S München,
pp 357 - 72
- 30 Kahn R. C. (1982)
Insulin receptors and syndromes of insulin resistance
Diabetes Care 5, Suppl. 1: 98 - 102
- 31 Kitabchi A. E., Stentz F. B. (1972)
Degradation of insulin and proinsulin by various organ
homogenates of rat
Diabetes 21: 1091 - 1101
- 32 Kitabchi A. E., Stentz F. B., Cole C., Duckworth W. C. (1979)
Accelerated insulin degradation: an alternate mechanism for
insulin resistance
Diabetes Care 2: 414 - 417
- 33 Klose S., Schlumberger H., Stähler F., Gruber W., Stinshoff
K., Röschlau P. (1977)
Eine praxisgerechte, enzymatische Cholesterinbestimmung
Med Lab 30: 29
- 34 Kolb H. J., Standl E. (1980)
An insulin-degrading enzyme from human erythrocytes: Isola-
tion and Characterization: in Brandenburg, Wollmer (eds)
Insulin chemistry, structure and function of insulin and
related hormones.
Walter de Gruyter, Berlin - New York pp 501 - 508
- 35 Kolb H. J., Standl E. (1980)
Purification to homogeneity of an insulin-degrading enzyme
from human erythrocytes
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 361: 1029 - 1039
- 36 Kolterman O. G., Reaven G. M., Olefsky J. M. (1979)
Relationship between in vivo insulin resistance and de-
creased insulin receptors in obese man
J. Clin. Endocrinol. Metab. 48: 487 - 494
- 37 Kolterman O. G., Gray R. S., Griffin J., Burnstein P.,
Insel J., Scarlett J. A., Olefsky J. M. (1981)
Receptor and post-receptor defects contribute to the insulin
resistance in non-insulin dependent diabetes mellitus
J. Clin. Invest 68: 957 - 969

- 38 Kosmakos F. C., Naguelesparan M., Bennet P. H. (1980)
Insulin binding to erythrocytes: a negative correlation
with red cell age
J. Clin Endocrin Metab 5: 46 - 50
- 39 Lang N., Kahn C. R., Chrambach A. (1980)
Characterization of the insulin receptor and insulin-de-
grading activity from human lymphocytes by quantitative
polyacrylamide gel electrophoresis
Endocrinology 106: 40 - 49
- 40 Maberly G. F., Wait G. A., Kilpatrick J. A., Loter E. G.,
Gain K., Stewart R., Eastman C. J. (1982)
Evidence for insulin degradation by muscle and fat tissue
in an insulin resistant diabetic patient
Diabetologia 23: 333 - 336
- 41 McDonald J. M., Davis J. E. (1979)
Glycosylated hemoglobins and diabetes mellitus
Human Path 10: 279
- 42 McElduff, Eastman C. J., Haynes S. F., Bowen K. M. (1980)
Apparent insulin resistance due to abnormal enzymatic insu-
lin degradation: a new mechanism for insulin resistance:
Aus NZ J Med 10: 56 - 61
- 43 Misbin R. J., Almira E. C., Cleman M. W. (1981)
Insulin degradation in the serum of a patient with apparent
insulin resistance
J. Clin. Endocrinol. Metab. 52: 117 - 180
- 44 Müller W. A., Taillers C., Léreret S., Berger M., Philippe
J., Halban P. A., Offord R. E. (1980)
Resistance against subcutaneous insulin successfully managed
with aprotinin
Lancet 1: 1245 - 1246
- 45 Neal G. W., Kitabchi A. E. (1982)
Insulin degradation by human skeletal muscle
Biochem Biophys Acta 719: 259 - 266
- 46 Nosadini R., Del Prato S., Tiengo A., Duner E., Toffolo G.,
Cobelli C., Faronato P. P., Moghetti P., Muggeo M. (1982)
Insulin sensitivity, binding and kinetics in pancreatogenic
and Type I diabetes
Diabetes 31: 346 - 355

- 47 Olefsky J. M. (1976)
The insulin receptor: its role in insulin resistance of obesity and diabetes
Diabetes 25: 1154 - 1162
- 48 Olefsky J. M., Kolterman O. G. (1981)
Mechanisms of insulin resistance in obesity and in non-insulin-dependent (type II) diabetes
Am J Med 70: 151 - 167
- 49 Paulsen E. P., Courtney J. W., Duckworth C. W. (1979)
Insulin resistance caused by massive degradation of subcutaneous insulin
Diabetes 28: 640 - 645
- 50 Pedersen O., Hjollund E., Beck-Nielsen H., Lindskov H. O., Sonne O., Gliemann J. (1981)
Insulin receptor binding and receptor mediated insulin degradation in human adipocytes
Diabetologia 20: 636 - 641
- 51 Pedersen O., Hjollund E. (1982)
Insulin receptor binding to fat and blood cells and insulin action in fat cells from insulin-dependent diabetics
Diabetes 31: 706 - 715
- 52 Philippe J., Halban P. A., Gjinovci A., Duckworth W. C., Estreicher J., Renold A. E. (1981)
Increased clearance and degradation of ^3H -Insulin in streptozotocin diabetic rats. Role of the insulin receptor compartment
J: Clin. Invest 67: 673 - 680
- 53 Poole G. P., O Connor K. J. O., Lazarus N., Pogson C. J. (1982)
 ^{125}I -labelled insulin degradation by isolated rat hepatocytes: the roles of glutathione-insulin transhydrogenase and insulin specific protease
Diabetologia 23: 49 - 53
- 54 Prager R., Schernthaner G. (1982)
Comparison of insulin receptor binding to monocytes and erythrocytes in newly diagnosed type II diabetes mellitus
Horm. Metabol. Res. 14: 561 - 563

- 55 Prager R., Schernthaner G. (1983)
Insulin binding of human and porcine monocomponent insulin
to monocytes in type I diabetic patients and control sub-
jects
Diabetologia 25: 235 - 237
- 56 Reaven G. M., Bernstein R., Davis B., Olefsky J. M. (1976)
Non-ketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin
resistance?
Am J Med. 60: 80 - 88
- 57 Sachs Lothar (1979)
Statistische Methoden
4. Aufl. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- 58 Scarlett J. A., Gray R. S., Griffin J., Olefsky J. M.,
Kolterman O. G. (1982)
Insulin treatment reverses the insulin resistance of type II
diabetes mellitus
Diabetes Care 5: 353 - 363
- 59 Scatchard G. (1949)
The attraction of proteins for small molecules and ions
Ann NY Acad Sci. 51: 660 - 672
- 60 Schneider J. (1982)
Messungen einer spezifischen Insulinaseaktivität in Ery-
throzyten von Normalpersonen und Diabetikern
LMU München, Inaugural Dissertation
- 61 Soman V. R., De Fronzo R. A. (1980)
Direct evidence for downregulation of insulin receptors
by physiologic hyperinsulinemia in man
Diabetes 29: 159 - 163
- 62 Testfibel Cholesterin (1981)
hrsg. von der Diagnostisch-Wissenschaftlichen Abteilung,
Boehringer Mannheim GmbH
- 63 Testfibel Hämoglobin A₁ (1981)
Chromatographischer Test für Hämoglobin A₁
hrsg. von der Diagnostisch-Wissenschaftlichen Abteilung,
Boehringer Mannheim GmbH
- 64 Testfibel Triglyzeride (1981)
hrsg. von der Diagnostisch-Wissenschaftlichen Abteilung,
Boehringer Mannheim GmbH

- 65 Terris S., Steiner D. F., (1975)
Binding and degradation of ^{125}I -insulin by rat hepatocytes
J. Biol. Chem 250: 8389 - 8398
- 66 Thomopoulos P., Berthellier M., Laudat M. H. (1978)
Loss of insulin receptors on maturation of reticulocytes
Biochem. Biophys. Research Comm. 85: 1460 - 1464
- 67 Tschesche H., Dietl T., Kolb H. J., Standl E. (1974)
An Insulin-Degrading Proteinase from Human Erythrocytes and
its Inhibition by Proteinase Inhibitors. in: Proteinase In-
hibitors, Springer Verlag pp 586 - 593
- 68 Van Kampen E. J. (1961)
Clin Chem Acta 6: 538
- 69 Varandani P. T. (1972)
Purification and properties of glutathione-insulin trans-
hydrogenase of rat liver
Biochem. Biophys. Acta: 286: 126 - 35
- 70 Wahlefeld A. W. (1974)
in Bergmeyer H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse
3. Aufl. Bd. II, Verlag Chemie, Weinheim S. 1878
- 71 Walter P., v. Specht B., Kolb H. J., Brandenburg D., Rapp J.,
Brendel W. (1983)
Insulinspezifische Immunsuppression durch kovalent an PVP
gebundenes Insulin
Allergologie 6: 272 - 276
- 72 Ward G. M., Rees A. R., Nylor B. A., Turner R. C. (1981)
The relationship of erythrocyte insulin receptors to the
cell age and to monocytes insulin receptors
Clin Endocrin 14: 269 - 278
- 73 Yalow R. S., Berson S. A. (1960)
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man
J. Clin Invest 39: 1157 - 1175
- 74 Yokono K., Imamura Y., Shii K., Sakai H., Baba S. (1981)
Purification and characterization of insulin-degrading enzyme
from pig skeletal muscle
Endocrinology 108: 1527 - 1532
- 75 Zweig S., Singer S. J. (1979)
J Cell Biol 80: 487 - 491

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. E. Standl für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die wertvolle Betreuung.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. H. J. Kolb vom Klinisch-Chemischen Institut des Städtischen Krankenhauses München Harlaching und allen Mitarbeitern seines Labors für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung des labortechnischen Teils der Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich allen Probanden, die an dieser Untersuchung teilgenommen haben.

LEBENS LAUF

Name:	Veronika Schott
geboren am:	05.11.1957 in Landshut
Eltern:	Thomas Schott, Ingenieur Luzie Schott, geb. David
1964 - 1968	Grundschule am elterlichen Wohnort in Moosburg
1968 - 1977	Gymnasium des Klosters Seligenthal in Landshut
	zunächst neusprachlicher Fachbereich
ab 1972	sozialwissenschaftlicher Bereich
1977	Abitur in der reformierten Oberstufe
SS 1978	Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
März 1980	ärztliche Vorprüfung
März 1981	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 1983	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 1983 - März 1984	Praktisches Jahr a) Innere Medizin im Städt. KH Landshut b) Chirurgie im Städt. KH Landshut c) Radiologie im Klinikum Großhadern
Mai 1984	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, seither Promotionsstudium

